

UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA



***STREPTOCOCCUS ANGINOSUS* COMO AGENTES DE  
INFECÇÃO EM HUMANOS: UM ESTUDO  
EPIDEMIOLÓGICO NUMA TAXONOMIA EM MUDANÇA**

RAQUEL BAPTISTA ARINTO GARCIA

DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM  
MICROBIOLOGIA MÉDICA

2014

UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA



***STREPTOCOCCUS ANGINOSUS* COMO AGENTES DE  
INFEÇÃO EM HUMANOS: UM ESTUDO  
EPIDEMIOLÓGICO NUMA TAXONOMIA EM MUDANÇA**

ORIENTADOR: PROFESSOR DOUTOR MÁRIO RAMIREZ (FMUL)

LOCAL: INSTITUTO DE MEDICINA MOLECULAR (IMM), UNIDADE DE  
MICROBIOLOGIA MOLECULAR E INFEÇÃO (UMMI)

ELO DE LIGAÇÃO: PROFESSORA DOUTORA ILDA SANCHES (FCT-UNL)

DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM MICROBIOLOGIA MÉDICA

RAQUEL BAPTISTA ARINTO GARCIA

2014

*Streptococcus anginosus* como agentes de infeção em Humanos: um estudo epidemiológico numa taxonomia em mudança

Copyright Raquel Baptista Arinto Garcia, FCT/UNL, UNL

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objectivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

### **Publicações decorrentes da presente dissertação:**

- R. Arinto-Garcia, M. D. Pinho, M. Ramirez e J. Melo-Cristino. 2013. “Analysis of several methods for phenotypic identification of the *Streptococcus anginosus* group in invasive infection”. Poster publicado em “EMBO Young Scientists’s Forum”, Lisboa, Portugal.
- R. Arinto-Garcia, M. D. Pinho, M. Ramirez e J. Melo-Cristino. 2014 “Comparison between phenotypic and genotypic methods for the identification of the *Streptococcus anginosus* group”. Aceite para publicação de poster na 24<sup>a</sup> edição do ECCMID, Barcelona, Espanha.

### **Financiamento do estudo:**

O estudo conducente à dissertação foi financiado por fundos próprios da Unidade de Microbiologia Molecular e Infecção (UMMI) do Instituto de Medicina Molecular (IMM), Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa.





## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar quero agradecer ao Professor Doutor Mário Ramirez, orientador científico desta dissertação de mestrado, pela disponibilidade e orientação ao longo de todo este projeto e pela confiança depositada. Agradeço igualmente ao Professor Doutor José Melo Cristino, Diretor do Instituto de Microbiologia da Faculdade de Medicina de Lisboa, a oportunidade de integrar esta equipa, que muito contribuiu para o meu enriquecimento tanto a nível profissional como pessoal.

Agradeço à Professora Doutora Ilda Sanches pelo apoio enquanto elo de ligação com a Faculdade de Ciências e Tecnologia (FCT-UNL).

Ao Doutor João Carriço pela disponibilidade, paciência e por todo o apoio bioinformático.

Ao meu tutor de laboratório, Mestre Marcos Pinho que colaborou na execução técnica, discussão dos trabalhos e na transmissão de conhecimentos.

À Doutora Sandra Aguiar por me ter orientado quando entrei no Instituto de Microbiologia e por me ter ensinado os procedimentos base no trabalho microbiológico e particularmente com *Streptococcus*.

A todos os meus colegas do Instituto de Microbiologia agradeço a amizade, companhia e apoio ao longo deste projeto, em especial à Joana M. Lopes, Joana P. Lopes, Catarina Pato, Andreia Horácio, Jorge Miranda e Sandra Matos.

Por fim agradeço à minha família e amigos que muito me incentivaram e apoiaram ao longo do meu percurso académico e por acreditarem em mim.

---

**RESUMO**

---

Estreptococos do grupo *anginosus* (SAG) são um grupo de bactérias comensais da microbiota do Homem. Contudo são também isoladas de infeção invasiva e não invasiva com diferentes apresentações, tendo uma considerável morbilidade e mortalidade. O grupo apresenta uma extensa diversidade fenotípica e genética, que dificulta a sua definição taxonómica e consequentemente a sua identificação. Atualmente SAG inclui seis *taxa*: *Streptococcus anginosus* subsp. *anginosus*, *S. anginosus* subsp. *whileyi*, *S. intermedius*, *S. constellatus* subsp. *constellatus*, *S. constellatus* subsp. *pharyngis* e *S. constellatus* subsp. *viborgensis*.

Este trabalho teve como objetivos avaliar e comparar os métodos de identificação existentes para o grupo com vista à escolha de um método de referência. Exploraram-se potenciais associações entre os diferentes *taxa* e os grupos etários, género, apresentação clínica e perfil de resistência aos antimicrobianos. Foi também analisada a clonalidade das estirpes que causam infeção no Homem. Por fim, foi estudada a diversidade genética inter-*taxa* e intra-*taxon*, a classificação e a divisão taxonómica de SAG.

Neste trabalho foram analisadas 213 estirpes provenientes de laboratórios hospitalares Portugueses, das quais 98 foram recolhidas de infeção invasiva e 115 de infeção não invasiva. Todas as estirpes foram caracterizadas pelo grupo de Lancefield e pelo tipo de hemólise. A susceptibilidade aos antimicrobianos foi testada através do método de difusão em disco de Kirby-Bauer e E-test. A identificação ao nível da espécie e subespécie foi feita por PCR com iniciadores para uma porção do gene que codifica a proteína de ligação à penicilina 2B (*pbp2b*), para o gene *16S rRNA* de *S. anginosus* e para os genes que codificam os fatores de virulência hialuronidase e intermedilisina. Este método foi assumido como “gold standard” e comparado com métodos de identificação não genotípicos: Enz 5 baseado na actividade enzimática ( $\beta$ -*N*-acetil-galactosaminidase,  $\beta$ -*N*-fucosidase,  $\alpha$ -glicosidase,  $\beta$ -glicosidase e  $\alpha$ -*N*-acetil-neuraminidase), Rapid ID 32 Strep e “Matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry” (MALDI-TOF-MS). As estirpes foram submetidas a tipagem molecular por “pulsed-field gel electrophoresis” (PFGE). A coleção invasiva foi analisada por “multilocus sequence analysis” (MLSA) e “multilocus sequence

typing” (MLST) através da sequenciação dos genes *map*, *pfl*, *ppac*, *pyk*, *rpoB*, *sodA* e *tuf*.

A infecção não invasiva foi mais frequente em crianças enquanto a população idosa está mais propensa à infecção invasiva. *S. intermedius* tem uma maior tendência para a infecção invasiva. As estirpes foram susceptíveis à maioria dos antimicrobianos testados. Os níveis de resistência mais elevados foram encontrados para a eritromicina, clindamicina e tetraciclina. O PCR mostrou, a sensibilidade, reprodutibilidade e poder discriminatório necessários para ser assumido como método de referência para SAG. Dos métodos utilizados na prática clínica, MALDI-TOF-MS mostrou ser o método mais congruente na identificação de SAG e mais atualizado dada a nova taxonomia. Porém, este método necessita ainda de um aumento da base de dados de modo a ser utilizado com confiança na identificação hospitalar de rotina. Os métodos de base enzimática como Rapid ID 32 Strep e Enz 5 são influenciados por diversos fatores que comprometem a sua reprodutibilidade e fiabilidade. Estes não devem ser utilizados como métodos de identificação de rotina ou de referência. Por PFGE e MLSA verificou-se uma baixa clonalidade da amostra. A diversidade do grupo, embora elevada, mostrou ser variável entre as espécies e subespécies sendo *S. anginosus* subsp. *anginosus* o *taxon* mais heterogéneo.

*S. anginosus* subsp. *whileyi* deve ser melhor caracterizado para que se confirmem os resultados genotípicos do presente estudo e para que se conheça a variabilidade do seu perfil fenotípico. A definição de *S. constellatus* subsp. *viborgensis* deve ser reanalisada dado que as diferenças apresentadas para com *S. constellatus* subsp. *pharyngis* não parecem suficientes para a definição de uma nova subespécie. De acordo com o presente estudo, este grupo é constituído por cinco *taxa*: *S. anginosus* subsp. *anginosus*, *S. anginosus* subsp. *whileyi*, *S. constellatus* subsp. *constellatus*, *S. constellatus* subsp. *pharyngis* e *S. intermedius*, distinguíveis por PCR. Esta taxonomia é apoiada por tipagem molecular (MLSA). A proposta de utilização de MLST para tipagem intra-*taxon* facilitará a comparação entre estudos e permitirá desenvolver o conhecimento acerca dos estreptococos do grupo *anginosus*.

---

**ABSTRACT**

---

The *Streptococcus anginosus* group (SAG) is a member of the human commensal microbiota. However, they are also isolated from invasive and noninvasive infections with diverse presentations, causing considerable morbidity and mortality. The great phenotypic and genetic diversity of SAG, compromises the taxonomic definition and consequently the reliable identification at the species and subspecies level. Currently SAG includes six *taxa*: *S. anginosus* subsp. *anginosus*, *S. anginosus* subsp. *whileyi*, *S. intermedius*, *S. constellatus* subsp. *constellatus*, *S. constellatus* subsp. *pharyngis* and *S. constellatus* subsp. *viborgensis*.

The aim of this work was to evaluate and compare existing identification methods for the group, in order to define a new reference method. The association between different *taxa* and patients' age groups, sex, clinical presentation and antimicrobial susceptibility profiles was tested. The clonality of the isolates infecting humans was determined. The genetic diversity between *taxa* and among isolates of the same *taxon* and the SAG classification and taxonomic division were studied.

In this study 213 isolates from Portuguese hospital laboratories were characterized, 98 of them isolated from invasive infection and 115 from noninvasive infection. The Lancefield group and type of hemolysis was determined for all isolates. Antimicrobial susceptibility was tested through the Kirby-Bauer disk diffusion test and E-test. The species and subspecies level identification was achieved by PCR with primers amplifying an internal fragment of the gene encoding the penicillin-binding protein 2B (*pbp2b*), *S. anginosus* 16S *rRNA* gene and genes encoding the virulence factors hyaluronate lyase and intermedilysin. Throughout this work, this method was used as the gold standard with which non-genotypic identification methods were compared: enzymatic activity (Enz 5:  $\beta$ -N-acetyl-galactosaminidase,  $\beta$ -N-fucosidase,  $\alpha$ -glucosidase,  $\beta$ -glucosidase e  $\alpha$ -N-acetyl-neuraminidase), Rapid ID 32 Strep and "Matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry" (MALDI-TOF-MS). The collection was subjected to molecular typing by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). In the invasive collection it was also performed multilocus sequence analysis (MLSA) and multilocus sequence typing (MLST) through the sequence of internal fragments of the genes *map*, *pfl*, *ppac*, *pyk*, *rpoB*, *sodA* and *tuf* genes.

An association between children and non-invasive disease was found, while the elderly population was associated with invasive infections. *S. intermedius* was the species more frequently associated with invasive infections. The isolates were susceptible to most of the antibiotics tested. The highest resistance levels were found for erythromycin, clindamycin and tetracycline. The reference method for SAG identification should be PCR, as used in the present study, because it showed the required discriminatory power, accuracy and reproducibility. Of the current methods used in daily clinical microbiology routine, the MALDI-TOF-MS proved to be the most suitable for SAG identification and the most adequate for the new taxonomy. Nonetheless, an increase in the spectra database is needed for this method to be used with confidence in the routine. The enzymatic based methods such as Rapid ID 32 Strep and Enz 5, are influenced by external factors, which compromise their reproducibility. Therefore, these methods should not be used in routine identification or as reference methods. PFGE and MLST showed that the collection was clonality diverse. However, this diversity was variable between species and subspecies with *S. anginosus* subsp. *anginosus* being the most heterogeneous *taxa*.

*S. anginosus* subsp. *whileyi* needs further characterization to confirm the genotypic results of the present study and to complete the phenotypic profile. The definition of *S. constellatus* subsp. *viborgensis* should be reconsidered since the differences to the subspecies *pharyngis* seem insufficient to define a new subspecies. We concluded that the *anginosus* group include five *taxa*: *S. anginosus* subsp. *anginosus*, *S. anginosus* subsp. *whileyi*, *S. constellatus* subsp. *constellatus*, *S. constellatus* subsp. *pharyngis* e *S. intermedius* differentiated by PCR. This taxonomy is supported by sequence information (MLSA). The use of MLST on isolates of the same *taxon* will facilitate the comparison between different studies and will expand the knowledge about the *Streptococcus anginosus* group.

---

**ÍNDICE**


---

<b>1. Introdução</b>	<b>1</b>
<b>1.1 <i>Streptococcus</i></b>	<b>1</b>
<b>1.2 Estreptococos do grupo <i>anginosus</i></b>	<b>2</b>
<b>1.3 Taxonomia</b>	<b>2</b>
<b>1.4 Colonização e infecção por <i>Streptococcus</i> do grupo <i>anginosus</i></b>	<b>5</b>
1.4.1 Co-infecção em <i>Streptococcus</i> do grupo <i>anginosus</i>	6
<b>1.5 Fatores de virulência</b>	<b>7</b>
1.5.1 Enzimas de despolimerização de glicosaminoglicanos (GAG): hialuronidase e sulfatase da condroitina	8
1.5.2 Atividade hemolítica	8
<b>1.6 Identificação e caracterização epidemiológica das estirpes</b>	<b>9</b>
1.6.1 Métodos não genotípicos	9
1.6.1.1 Antigénio de Lancefield e hemólise	9
1.6.1.2 Provas bioquímicas para diferenciação e identificação de SAG	10
1.6.1.3 “Matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry” (MALDI-TOF-MS)	11
1.6.2 Métodos genotípicos	12
1.6.2.1 Métodos de análise de um único <i>locus</i>	12
1.6.2.2 “Multilocus sequence analysis” (MLSA)	13
1.6.2.3 “Pulsed-field gel electrophoresis” (PFGE)	14
<b>1.7 Perfil de suscetibilidade a antimicrobianos</b>	<b>14</b>
<b>1.8 Objetivos</b>	<b>16</b>
<b>2. Materiais e Métodos</b>	<b>17</b>
<b>2.1 Coleção de estirpes</b>	<b>17</b>
<b>2.2 Estirpes de referência e controles</b>	<b>18</b>
<b>2.3 Caracterização e identificação não genotípica</b>	<b>18</b>
2.3.1 Hemólise	18
2.3.2 Classificação de Lancefield	18
2.3.3 Sistema de identificação Rapid ID 32 STREP	19

---

2.3.4 MALDI-TOF MS	20
2.3.5 Atividade enzimática	21
2.3.6 Presença dos fatores de virulência: hialuronidase e sulfatase da condroitina	22
<b>2.4 Métodos de identificação e tipagem genotípica</b>	<b>23</b>
2.4.1 Obtenção do DNA cromossômico	23
2.4.2 Reagentes e termocicladores	23
2.4.3 Identificação da espécie e subespécie por PCR	23
2.4.4 MLSA	24
2.4.5 Eletroforese em gel de agarose	25
<b>2.5 Análise estatística</b>	<b>26</b>
<b>2.6. Análise da diversidade genética por PFGE</b>	<b>27</b>
a) Preparação dos discos de DNA	27
b) Digestão dos discos com endonuclease	28
c) Eletroforese em campo pulsado	28
d) Análise dos perfis de restrição	29
<b>2.7 Determinação da suscetibilidade aos antimicrobianos</b>	<b>29</b>
2.7.1 Difusão em disco	30
2.7.2 E-teste	30
2.7.3 Fenótipos de resistência aos macrólidos	30
<b>3. Resultados</b>	<b>31</b>
<b>3.1 Identificação das estirpes</b>	<b>31</b>
<b>3.2 Caracterização fenotípica das estirpes</b>	<b>32</b>
3.2.1 Hemólise e grupo de Lancefield	32
<b>3.3 Caracterização da amostra</b>	<b>34</b>
3.3.1 Grupos etários	34
3.3.2 Género	35
3.3.3 Invasividade	35
3.3.4 Produto	36
<b>3.4 Identificação não genotípica</b>	<b>40</b>
3.4.1 Rapid ID 32 STREP	40
3.4.2 MALDI-TOF MS	44

3.4.3 Identificação e atividade enzimática	46
3.4.4 Comparação dos métodos não genotípicos	48
3.4.4 Presença dos fatores de virulência: hialuronidase e sulfatase da condroitina	51
<b>3.5. Tipagem Molecular</b>	<b>51</b>
3.5.1 PFGE	51
3.5.2 MLSA – análise de perfis alélicos por MLST	54
3.5.3 MLSA – análise das sequências concatenadas	57
<b>3.6 Determinação da suscetibilidade aos antimicrobianos</b>	<b>61</b>
<b><u>4. Discussão e Conclusões</u></b>	<b><u>63</u></b>
4.1 Caraterização das estirpes	63
4.2 Métodos de identificação	65
4.3 Taxonomia	70
4.3.1 <i>S. anginosus</i> subsp. <i>whileyi</i> , <i>S. constellatus</i> subsp. <i>pharyngis</i> e <i>S. constellatus</i> subsp. <i>vibrogensis</i>	73
4.4 PFGE	79
4.5 Antimicrobianos	81
4.6 Conclusões	84
<b><u>5. Referências bibliográficas</u></b>	<b><u>85</u></b>
<b><u>6. Anexos</u></b>	<b><u>97</u></b>



---

**ÍNDICE de QUADROS**


---

<b>Quadro 1:</b> Caraterização quanto ao grupo de Lancefield e hemólise das espécies e subespécies de SAG.....	5
<b>Quadro 2:</b> Identificação de SAG e perfil fenotípico pelo método de referencia.....	10
<b>Quadro 3:</b> Distribuição de produtos biológicos na amostra (n=227). ....	18
<b>Quadro 4:</b> Estirpes de SAG presentes na base de dados de MALDI-TOF, versão 3.3.1.1, <i>Bruker® Corporation</i> , Alemanha. ....	20
<b>Quadro 5:</b> Sistema de pontuações atribuídas pelo software do MALDI-TOF, <i>Bruker® Corporation</i> , Alemanha, adaptado.....	21
<b>Quadro 6:</b> Volumes e concentrações utilizadas de cada reagente na mistura reacional para PCR. ....	24
<b>Quadro 7:</b> Antimicrobianos utilizados no presente estudo e respectiva classe. ....	29
<b>Quadro 8:</b> Distribuição da amostra pelos <i>taxa</i> de SAG .....	31
<b>Quadro 9:</b> Identificação hospitalar das estirpes de cada espécie e subespécie de SAG.	32
<b>Quadro 10:</b> Caracterização da amostra quanto à hemólise e ao grupo de Lancefield...	33
<b>Quadro 11:</b> Análise estatística da invasividade, grupo de Lancefield, faixa etária, género e hemólise. ....	34
<b>Quadro 12:</b> Distribuição das estirpes pelos diferentes <i>taxa</i> e produtos de isolamento das mesmas. ....	37
<b>Quadro 13:</b> Análise estatística da caracterização da amostra em função do <i>taxon</i> . ....	38
<b>Quadro 14:</b> Análise estatística da caracterização da amostra em função do grupo etário e sexo. ....	39
<b>Quadro 15:</b> Concordância das estirpes sujeitas ao sistema de galerias API Rapid ID Strep com o PCR.....	41

<b>Quadro 16:</b> Análise estatística dos métodos de leitura para o Rapid ID 32 Strep - teste de Fisher, simples e ajustado para testes múltiplos (FDR), e teste do qui-quadrado.....	42
<b>Quadro 17:</b> Reações enzimáticas nas galerias de Rapid ID 32 Strep por LA. ....	43
<b>Quadro 18:</b> Exemplo de identificação por MALDI-TOF para uma estirpe de <i>S. anginosus</i> subsp. <i>anginosus</i> . ....	44
<b>Quadro 19:</b> Concordância das estirpes sujeitas ao MALDI-TOF com o PCR.....	45
<b>Quadro 20:</b> Identificação obtida pelo método enzimático (colunas) em função PCR (linhas). ....	47
<b>Quadro 21:</b> Percentagem de degradação de cada substrato em função do <i>taxon</i> . ....	47
<b>Quadro 22:</b> Quadro-resumo das da percentagem de identificações correctas em relação ao PCR nos métodos fenotípicos aplicados. ....	48
<b>Quadro 23:</b> Estatística de Kappa da identificação final dos três métodos. ....	50
<b>Quadro 24:</b> Não suscetibilidade a múltiplos antimicrobianos.....	62
<b>Quadro 25:</b> Perfis alélicos das estirpes analisadas por MLST com recurso aos genes de MLSA. ....	97
<b>Quadro 26:</b> Oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas reações de PCR.....	100
<b>Quadro 27:</b> Programas utilizados nas reações de PCR com os diferentes oligonucleotídeos iniciadores. ....	100

---

---

*ÍNDICE de FIGURAS*


---

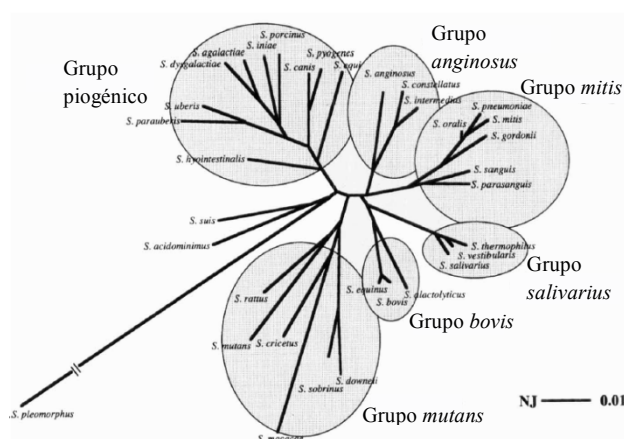
<b>Figura 1:</b> Relações filogenéticas entre 34 espécies estreptocócicas.....	1
<b>Figura 2:</b> Ilustração dos três tipos de hemólise presentes em SAG.....	2
<b>Figura 3:</b> Princípio da técnica MALDI-TOF- MS, adaptado. ....	12
<b>Figura 4:</b> Esquema de PCR utilizado para a identificação do grupo, espécie e subespécie.....	24
<b>Figura 5:</b> Fotografia de gel de agarose de PCR em “multiplex”.....	31
<b>Figura 6:</b> A) Representação gráfica da distribuição das amostras como provenientes de infecções invasivas ou não invasivas pelas classes etárias. B) Representação gráfica da distribuição dos produtos biológicos pelas classes etárias.....	35
<b>Figura 7:</b> Representação gráfica da percentagem de estirpes dos diversos taxa em função do género (A) e em função da proveniência das amostras de infecção invasiva ou não invasiva (B).....	36
<b>Figura 8:</b> Exemplo de resultado obtido com o Rapid ID 32 Strep.....	40
<b>Figura 9:</b> Exemplo de resultado obtido para o substrato $\alpha$ -ANA .....	46
<b>Figura 10:</b> Comparação das discrepâncias obtidas pelo Rapid ID 32 Strep e MALDI-TOF.....	50
<b>Figura 11:</b> Fotografia de um gel de PFGE, com a enzima SmaI, para 27 estirpes de SAG. ....	51
<b>Figura 12:</b> Dendrogramas dos perfis obtidos por PFGE das 213 estirpes incluídas neste estudo. ....	53
<b>Figura 13:</b> Diagrama de análise de perfis alélicos por MLST (PHYLOViZ, goeBURST Full MST) de 177 estirpes de SAG.....	58
<b>Figura 14:</b> Diagrama em função das sequências alélicas de cada um dos sete genes que constituem o MLSA (PHYLOViZ, goeBURST Full MST). ....	59
<b>Figura 15:</b> Dendrograma das sequências concatenadas segundo o método “minimal evolution” (programa MEGA).....	60
<b>Figura 16:</b> Percentagem de não susceptibilidade aos antimicrobianos em SAG (A). Fenótipo de resistência MLSB (B). ....	62

## 1. Introdução

### 1.1 *Streptococcus*

Os *Streptococcus*, género bacteriano de Gram-positivo pertencente à família *Streptococcaceae*, foram inicialmente diferenciados em função da sua capacidade hemolítica, importante para a virulência e presente nalgumas espécies. Estirpes com capacidade de hemólise total dos eritrócitos incorporados no meio de crescimento, distinguem-se por um halo claro ou translúcido, observado em torno das colónias, conhecido como  $\beta$ -hemólise. A capacidade de hemólise parcial, hemólise  $\alpha$ , provoca uma coloração verde em torno das colónias. Por último, algumas estirpes não provocam qualquer hemólise dos eritrócitos do meio, denominando-se  $\gamma$ -hemolíticas (118). Em 1933, Rebecca Lancefield propõe o primeiro sistema de classificação para os *Streptococcus*  $\beta$ -hemolíticos, ainda hoje utilizado, através de estudos de diferenciação serológica, que se basearam nas diferenças da composição do hidrato de carbono-C, com propriedades antigénicas, localizado na parede celular (72).

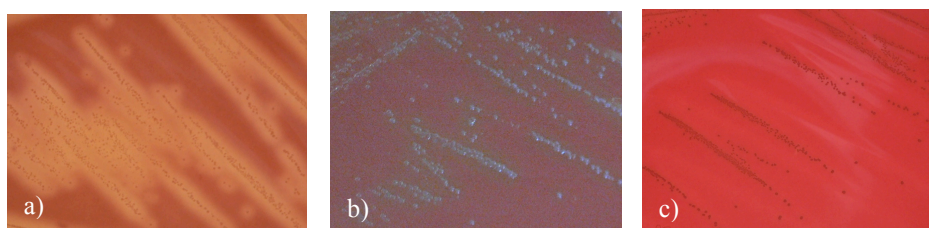
Porém, no que respeita à classificação atual do género *Streptococcus*, com base na sequenciação da unidade 16S do RNA ribossomal (*rRNA 16S*) e em conjunto, tanto com outros estudos taxonómicos, como com características bioquímicas, serológicas (como o grupo de Lancefield) e hemolíticas, são reconhecidos seis grupos filogenéticos, os grupos: piogénico, *anginosus*, *mitis*, *salivarius*, *bovis* e *mutans*, sendo os últimos cinco por vezes identificados como pertencentes ao grupo mais abrangente dos *Streptococcus viridans* (figura 1) (29, 42, 68).



**Figura 1 :** Relações filogenéticas entre 34 espécies estreptocócicas. Distâncias calculadas pelo método “neighbor-joining”(NJ). Adaptado de kawamura *et al.*, 1995 (68).

## 1.2 Estreptococos do grupo *anginosus*

Estreptococos do grupo *anginosus* [*Streptococcus anginosus* group (SAG)] previamente designados Estreptococos do grupo *milleri* (119, 122) são um grupo de bactérias formadoras de pequenas colônias (<0,5mm), que inclui as espécies *S. anginosus*, *S. intermedius* e *S. constellatus*. *S. anginosus* contempla ainda as subespécies *anginosus* e *whileyi* enquanto *S. constellatus* inclui as subespécies *constellatus*, *pharyngis* e *viborgensis*, segundo a taxonomia mais recente (64)<sup>1</sup>. São anaeróbios facultativos mas em algumas estirpes, a incubação com 5% de CO<sub>2</sub> ou em anaerobiose favorece o seu crescimento (59). SAG apresentam reações hemolíticas, serológicas e fisiológicas heterogêneas uma vez que podem ser  $\alpha$ ,  $\beta$ , ou  $\gamma$ -hemolíticos (figura 2). Apesar de serem muitas vezes não-tipáveis, podem apresentar o antígeno A, C, F ou G de Lancefield. Bioquimicamente, hidrolisam a arginina, não fermentam a ribose, são resistentes à bacitracina e produzem acetoina [pela reação de Voges-Proskauer (VP) (9, 28)].



**Figura 2:** Ilustração dos três tipos de hemólise presentes em SAG. a) Estirpe  $\beta$ -hemolítica de *S. anginosus* subsp. *anginosus*; b) Estirpe  $\alpha$ -hemolítica de *S. constellatus* ssp. *constellatus*; c) Estirpe  $\gamma$ -hemolítica de *S. intermedius*.

## 1.3 Taxonomia

Em 1956, Guthof propôs o nome *Streptococcus milleri*, hoje conhecidos como SAG, para um grupo de estreptococos não-hemolíticos e não identificados pelo método de Lancefield, isolados de abscessos e outras lesões na cavidade oral. Descritos como crescendo em agar enriquecido com 40% de sais biliares a 45°C, as estirpes hidrolisavam a esculina e a arginina, mas não produziam ácido a partir do manitol ou sorbitol (5, 126). Contudo atualmente o grupo tem sido identificado como agente causador de infecções purulentas em diversos órgãos internos, assim como infecções gastrointestinais e genito-urinárias (35, 88). Foram posteriormente incluídas neste grupo estirpes hemolíticas, com as restantes características definidas para o grupo (25, 87),

<sup>1</sup> Dado que *S. constellatus* subsp. *viborgensis* apenas foi descrito em 2013 (64), e que, ao contrário de *S. anginosus* subsp. *whileyi*, nunca antes tinha sido destacado este grupo de estirpes, este *taxon* não foi tido

desde que apresentassem uma reação de VP positiva e capacidade de hidrolisarem a esculina (88). No entanto, já na década de 1970 se afirmava que a variabilidade existente impossibilitava a definição de uma demarcação clara do grupo, pois algumas estirpes não reagiam com um ou mais dos testes bioquímicos nos quais uma reação positiva era característica de *S. milleri* (5). As características uniformes como o reduzido tamanho das colónias e o cheiro característico a caramelo (5, 27), estão muito dependentes do meio e do observador, não podendo ser por isso usadas como critérios de distinção. Assim, a formação de abscessos num largo conjunto de órgãos parecia ser a única característica unificadora neste grupo tão heterogêneo, visto que apenas com um conjunto alargado de testes bioquímicos e serológicos se conseguem distinguir com alguma confiança *S. milleri* dos membros piogénicos dos grupos A, C e G (5).

O aparecimento de técnicas genotípicas capazes de diferenciar ao nível da espécie foi essencial para a definição taxonómica deste grupo dado que desde a descrição de SAG foi discutido se estes microrganismos deveriam ser incluídos todos numa mesma espécie ou se a heterogeneidade presente era suficiente para serem divididos em três espécies: *S. anginosus*, *S. constellatus* e *S. intermedius*. Estudos de hibridação DNA-DNA assim como análise eletroforética das proteínas celulares totais concluíram que *S. intermedius* é claramente menos relacionado com as outras duas espécies. Ainda assim não era possível diferenciar *S. anginosus* e *S. constellatus*, tendo-se por isso concluído que estas três unidades taxonómicas formam uma linhagem e espécie única (27, 28, 115, 116). Pelo contrário outros autores, também por técnicas de hibridação de DNA verificaram que se identificavam três grupos de homologia, centrados nas estirpes tipo das três espécies de SAG (69, 126). Finalmente com o aparecimento de estudos de sequenciação do gene *rRNA 16S*, esta separação é agora considerada consensual (13, 22, 56, 68, 124) e em 1991 são descritas as três espécies de SAG (119) (quadro 1). Contudo, ao contrário dos estudos anteriores por reassociação de DNA, esta análise revela que *S. constellatus* e *S. intermedius* são mais relacionados geneticamente entre si, sendo *S. anginosus* mais distante (22). Ainda assim, continuava a verificar-se bastante heterogeneidade intra-espécie, principalmente nas espécies *S. anginosus* (58, 125) e *S. constellatus* (56). Através da hibridação com sondas específicas para *rRNA 16S* das três espécies, descobriu-se que existia um pequeno grupo de estirpes que se ligava tanto com a sonda específica para *S. constellatus* como para *S. intermedius*. Apesar de pela

sequenciação do gene codificando o *rRNA 16S* ser mais semelhante a *S. constellatus* (56), verificou-se que a relação de semelhança do seu DNA com esta espécie era de apenas 61-77% e havia diferenças na temperatura de hibridação. Fenotipicamente, este grupo correspondia a estirpes  $\beta$ -hemolíticas do grupo C, com diferenças na degradação enzimática, associadas à orofaringe humana e particularmente a casos de faringite. A clara discriminação destas estirpes das estirpes típicas de *S. constellatus*, quer fenotipicamente quer em estudos de reassociação do DNA, permitiram a descrição de *S. constellatus* subsp. *pharyngis*. Consequentemente, as estirpes antes descritas como *S. constellatus* são em 1999 reclassificadas como *S. constellatus* subsp. *constellatus* (quadro 1) (124).

Também por estudos de hibridação DNA-DNA foi sugerido que a espécie *S. anginosus* era suficientemente heterogênea para poder ser dividida em subespécies (126). Foi descrito que em estirpes com maior capacidade fermentativa, a zona de separação intergênica entre as regiões codificando os *rRNA16S* e 23S de 350 pb era mais curta que nos restantes *S. anginosus*. Estas estirpes possuíam características bioquímicas intermédias cujo esquema aceite (122) não era suficiente para a identificação (121, 124, 125). Caracterizavam-se pela  $\beta$ -hemólise e pelo antígeno C de Lancefield presente na parede e, ao contrário das restantes estirpes de *S. anginosus*, produziam hialuronidase (43), tendo o seu gene 98% de semelhança com o mesmo gene de *S. constellatus* subsp. *constellatus* (109). Quando hibridadas com sondas específicas para os genes do *rRNA* apenas se ligavam às sondas específicas para o grupo, mas não com a sonda de nenhuma das espécies pois a sua sequência ao nível do gene da unidade ribossomal 23S tinha três bases diferentes para a de *S. anginosus* (104). Contudo, ao contrário de *S. constellatus* subsp. *pharyngis*, estas não apresentavam um padrão bioquímico inequívoco nem uma associação particular com determinadas infeções ou locais anatómicos, o que questionava o seu reconhecimento como subespécie e durante vários anos foram descritas como estirpes *S. anginosus* “DNA group 2” (124). Em 2004, é descrito um método de identificação para as estirpes do grupo por “polimerase chain reaction” (PCR) em que é possível distinguir entre as estirpes “DNA group 2” e as estirpes de *S. anginosus* (109). No entanto, só em 2013 esta subespécie foi descrita como *S. anginosus* subsp. *whileyi*, confirmada pelo método de “multilocus sequence analysis” (MLSA) (64). No mesmo estudo, foi descrita outra linhagem distinta

filogeneticamente, originando a subespécie *viborgensis* de *S. constellatus*. Tal como *S. constellatus* subsp. *pharyngis* é constituída por estirpes  $\beta$ -hemolíticas do grupo C de Lancefield, recolhidas de doentes com inflamação na orofaringe (64). A distinção é feita pela ausência da cisão de orto-nitro-fenil-galactósido (ONPG) (64).

**Quadro 1:** Caraterização quanto ao grupo de Lancefield e hemólise das espécies e subespécies de SAG

Espécie/Subespécie	Hemólise	Grupo de Lancefield	Descrição
<i>S. anginosus</i> subsp. <i>anginosus</i>	$\beta$ , não- $\beta$	A, C, F, G, N	Whiley <i>et al.</i> 1991 (119) Corrigida: Jensen <i>et al.</i> 2013 (64)
<i>S. anginosus</i> subsp. <i>whileyi</i>	$\beta$	C	Jensen <i>et al.</i> 2013 (64)
<i>S. constellatus</i> subsp. <i>constellatus</i>	$\beta$ , não- $\beta$	F, N	Whiley <i>et al.</i> 1991(119) Corrigida: Whiley <i>et al.</i> 1999 (124)
<i>S. constellatus</i> subsp. <i>pharyngis</i>	$\beta$	C	Whiley <i>et al.</i> 1999 (124)
<i>S. constellatus</i> subsp. <i>viborgensis</i>	$\beta$	C	Jensen <i>et al.</i> 2013 (64)
<i>S. intermedius</i>	$\beta$ , não- $\beta$	N	Whiley <i>et al.</i> 1991 (119)

#### 1.4 Colonização e infeção por *Streptococcus* do grupo *anginosus*

Os SAG estão presentes enquanto agentes colonizadores na microbiota da cavidade oral, principalmente associados aos dentes, às raízes destes (74, 79, 86, 91, 123) e à nasofaringe (21, 91) mas também no trato digestivo incluindo o apêndice (91, 92) e no aparelho genito-urinário feminino (21, 91), em indivíduos saudáveis. No entanto, são causadores de infeção purulenta em vários territórios e estão fortemente associados à formação de abscessos (6, 21, 120, 123), que ocorrem após a rutura da barreira epitelial ou mucosa como em casos de ulceração, perfuração, inflamação e cirurgia (41, 55, 62). Bacteriémia, endocardite, abscessos (na pele, cavidade oral, cabeça e pescoço, fígado, tecidos moles ou músculo), empiema pleural e outras infeções torácicas, infeções no sistema nervoso central (SNC) e infeção abdominal são algumas das infeções descritas (19, 21, 22, 26, 35, 39, 47, 54, 55, 59, 74, 81, 88, 91, 102, 114, 120). Foram já sugeridas algumas condições predisponentes para a infeção, tais como cirurgia prévia, trauma, diabetes, imunodeficiência e dispositivos protéticos (15, 114). A seguir a *Staphylococcus aureus*, são as estirpes mais frequentemente isoladas de pele e tecidos moles de feridas traumáticas e cirúrgicas (105). Estas infeções causam frequentemente morbilidade e podem requerer além de terapia com antimicrobianos, drenagem cirúrgica (54, 97, 112). SAG causam infeção maioritariamente em adultos mas são também agentes patogénicos em populações pediátricas, na região da cabeça e pescoço, e causadores de abscessos no fígado, tendo propensão para a extensão local a partir destes territórios (20, 47, 66, 74).



O isolamento de *Streptococcus* do grupo *viridans*, numa cultura de sangue indica frequentemente contaminação ou bacteriemia transitória sem significado clínico. No entanto, SAG raramente são contaminantes, e a sua presença em hemoculturas deve ser interpretada como bacteriemia que poderá ser indicativa de uma doença focal purulenta ou endocardite (19). A identificação ao nível da espécie é importante devido à gravidade das infeções causadas (81).

Tendo sido os abscessos na cavidade oral o ponto de partida para a descrição de SAG (45), atualmente este continua a ser um grupo prevalente de microrganismos quando analisadas estirpes recolhidas de infeções dento-alveolares (74). No entanto, este tipo de infeções não se limita à cavidade oral e apesar da maioria das infeções por SAG serem devido a abscessos que se poderão localizar por todo o corpo (21, 102), as espécies que constituem o grupo não são causadores com a mesma frequência. *S. intermedius* e *S. constellatus* são mais propensos a causar abscessos do que *S. anginosus*. *S. intermedius*, relativamente limitado na sua distribuição, tem como infeção predominante os abscessos, que tendem a estar associados a uma propagação hematogénea, sendo mais profundos e extensos (21, 55). São exemplos disso o caso de abscessos por *S. intermedius* no SNC e hepáticos (20, 21, 35, 39, 80) e empiemas torácicos, assim como infeções profundas nos tecidos moles e osso (21, 55, 120). Por outro lado, *S. constellatus*, frequentemente isolado na microbiota e raramente implicado em casos de bacteriemia, causa abscessos mais superficiais e localizados. Embora possua um espectro maior de infeções, na maior parte dos casos estas localizam-se na cavidade oral, orofaringe e pescoço. (21, 55).

O sangue é o segundo local mais comum de onde SAG são recolhidos, predominando a espécie *anginosus* (21, 22). A formação de abscessos, normalmente no abdómen é uma fonte comum de bacteriemia, sendo a maioria hepáticos (19, 97). *S. anginosus* são ainda a espécie mais frequentemente isolada do aparelho genito-urinário e da zona peri-rectal (35, 55, 120, 122). A maior prevalência de um modo geral de *S. anginosus* entre os isolados de SAG (6, 8, 35, 54) pode refletir a maior dispersão de zonas de colonização desta espécie quando comparada com *S. intermedius* e *S. constellatus* ou indicar a existência de mecanismos de patogenicidade mais eficazes em *S. anginosus* (35).

#### **1.4.1 Coinfeção em *Streptococcus* do grupo *anginosus***

Sendo SAG parte da microbiota humana são encontrados em conjunto com outras espécies bacterianas, não só na colonização como por vezes na infeção (6, 81, 102).

Assim, provocam infecção em associação com outros géneros bacterianos, aeróbios ou anaeróbios, principalmente nos abscessos mais superficiais como na cavidade oral. Pelo contrário, nos abscessos mais profundos, como hepáticos, e em casos de bacteriemia, são frequentemente o único agente de infecção (6, 19, 26, 54, 97). Deste modo, também devido aos locais que infetam com maior frequência, *S. intermedius* é encontrado na maioria das vezes isoladamente enquanto *S. anginosus* e *S. constellatus* têm maior possibilidade de serem encontrados em infeções polimicrobianas (21, 35). Foi já sugerido que nestes casos se observa uma taxa de multiplicação superior e uma supressão significativa da capacidade fagocítica dos leucócitos polimorfonucleares humanos, dado que SAG possuem uma atividade anti-fagocítica sobre os mesmos (21, 85, 101, 129). Origina-se assim um efeito sinérgico que se reflete num aumento do tamanho dos abscessos quer na cavidade oral, quer no aparelho gastrointestinal ou respiratório, e aumento da morbilidade e mortalidade (21, 85, 101, 129). Foram ainda sugeridos outros mecanismos que favorecem a coinfeção como o facto de SAG conseguirem proliferar em regiões de baixa tensão de oxigénio, reduzindo ainda mais a concentração do mesmo, o que favorece o crescimento de anaeróbios estritos. Propôs-se também que a interação entre SAG e a matriz extracelular, particularmente a adesão às cadeias de glicosaminoglicanos (GAG) do biglicano e decorina, ambos proteínoglicanos que fazem parte da matriz não colagenosa, promove a colonização, facilita a invasão bacteriana para tecidos mais profundos e a disseminação sistémica (73).

### **1.5 Fatores de virulência**

As bactérias do grupo *anginosus*, tal como tantas outras, produzem uma gama de enzimas extracelulares que, devido à sua capacidade de degradar macromoléculas do hospedeiro e por isso facilitar a propagação da bactéria, são considerados potenciais fatores de virulência. Grande parte das estirpes do grupo *anginosus* produzem RNases e DNases sendo que *S. intermedius* é a espécie que mais produz este tipo de enzimas (60). A sialidase ou neuraminidase é uma glucosidase produzida por todas as estirpes de *S. intermedius*, provavelmente de forma constitutiva, estando ausente em *S. constellatus* e *S. anginosus* (11). São ainda reconhecidos enquanto fatores de virulência as enzimas de despolimerização de GAG e as hemolisinas.

### 1.5.1 Enzimas de despolimerização de glicosaminoglicanos (GAG): hialuronidase e sulfatase da condroitina

GAG são um grupo de polissacáridos lineares compostos por repetições de unidades dissacáridas que incluem o sulfato de condroitina e o ácido hialurônico. Estes interagem com outras proteínas fibrosas para formar uma matriz extracelular que mantém a integridade estrutural do tecido do hospedeiro. As enzimas hialuronidase e sulfatase da condroitina despolimerizam estas cadeias, quebrando as ligações  $\beta$ -1-4 dos GAG (100). Metade do ácido hialurônico do corpo é encontrado na pele, o que faz com que a maior parte das espécies capazes de sintetizar hialuronidase sejam capazes de causar infecções iniciadas na pele ou nas superfícies mucosas (50, 53, 100). A produção de hialuronidase é induzida na presença do substrato. Da sua degradação resultam dissacáridos insaturados (53), que podem depois ser transportados e metabolizados intracelularmente para fornecer os nutrientes necessários para o crescimento, replicação e propagação bacteriana, num ambiente que de outra forma seria nutricionalmente pobre (53, 84, 100). Para além disso verifica-se um aumento da permeabilidade dos tecidos conjuntivos o que facilita a propagação dos microrganismos e toxinas (50, 53). Entre os SAG, apenas as estirpes de *S. anginosus* subsp. *anginosus* não são produtoras de hialuronidase enquanto *S. intermedius* demonstra a maior atividade enzimática (50, 108, 109). Em *S. intermedius* a hialuronidase é capaz de promover a desagregação da superfície das mucosas, o que leva à invasão de tecidos mais profundos (89). A atividade da sulfatase da condroitina está apenas presente em *S. constellatus* subsp. *pharyngis* e *S. intermedius*. Contudo, demonstrou-se que a função de despolimerização do sulfato de condroitina é desempenhada pela hialuronidase. Existem assim dois tipos de hialuronidase no grupo *anginosus*: a que consegue quebrar tanto ácido hialurônico como sulfato de condroitina e a que apenas degrada ácido hialurônico (109).

### 1.5.2 Atividade hemolítica

A intermedilina foi a primeira hemolisina descrita em SAG e é responsável pela atividade hemolítica observada em *S. intermedius*. Pertence a uma classe de citolisinas dependentes de colesterol, formadoras de poros que são importantes fatores de virulência numa variedade de bactérias de Gram-positivo, incluindo alguns grupos de *Streptococcus*. Ao contrário de outras citolisinas é específica para as células humanas devido ao recetor proteico a que se liga (CD59) (70, 84), justificando a observação da

lise dos eritrócitos apenas na presença de sangue humano (57). Esta toxina, consegue danificar diretamente e lisar as células do hospedeiro, incluindo as células do sistema imunitário humano como os neutrófilos e as linhas celulares constituintes dos órgãos propensos à infecção por *S. intermedius* (83, 84). Assim, pode funcionar como escapatória ao sistema imunitário ao lisar os macrófagos que eliminam a bactéria do sangue, permitindo-lhe atingir um local anatómico profundo (84). Está presente em todas as estirpes de *S. intermedius* e é sugerido como fator de virulência principal, visto ser provavelmente o fator fundamental para se estabelecerem infecções profundas (84, 111). Não foram encontrados homólogos para esta hemolisina em *S. anginosus* e *S. constellatus* (3, 84, 106). Assim, foi sugerido como marcador útil para amplificação por PCR e distinção de *S. intermedius* das restantes estirpes de SAG (84, 109).

A estreptolisina S, péptido citolítico pertencente a um grupo diferente de  $\beta$ -hemolisinas, é responsável pela hemólise em *S. pyogenes* e codificada pelos componentes do operão *sag*. Um operão homólogo de *sag* foi encontrado em *S. anginosus*, com a diferença de ser constituído por 10 genes, dado que inclui duas cópias do gene *sagA* (*sagA1* e *sagA2*). A estreptolisina S não está presente em todas as estirpes de *S. anginosus* mas é a responsável pela hemólise nas estirpes  $\beta$ -hemolíticas, conseguindo lisar tanto eritrócitos de carneiro como humanos (3, 106). No entanto, *S. anginosus* não consegue libertar uma hemolisina ativa, a partir da superfície celular, e provavelmente por isso a estreptolisina S não induz os clássicos poros hemolíticos, estando presente um outro mecanismo desconhecido pelo qual esta hemolisina provoca  $\beta$ -hemólise (3, 106). Também já foi descrito este gene em *S. constellatus*. Possui uma sequência nucleotídica com cerca de 85% de identidade, enquanto a proteína codificada tem um semelhança de 73-93% (3). Não são ainda conhecidos os mecanismos responsáveis pela  $\alpha$ -hemólise em SAG.

## 1.6 Identificação e caracterização epidemiológica das estirpes

### 1.6.1 Métodos não genotípicos

#### 1.6.1.1 Antígeno de Lancefield e hemólise

Ao contrário dos *Streptococcus*  $\beta$ -hemolíticos do grupo piogénico, em SAG o antígeno de Lancefield e a capacidade hemolítica não constituem métodos úteis de identificação dada a variabilidade já mencionada. Ainda assim, existem algumas diferenças na

prevalência destes antígenos e hemólises nas diferentes espécies e subespécies do grupo, tal como se observa no quadro 2 (33).

### 1.6.1.2 Provas bioquímicas para diferenciação e identificação de SAG

Em 1990 é descrito por Whiley *et al.* um método de diferenciação e identificação de SAG onde é testada a capacidade de as estirpes produzirem as enzimas  $\beta$ -D-fucosidase,  $\beta$ -N-acetil-glicosaminidase,  $\beta$ -N-acetil-galactosaminidase,  $\alpha$ -N-acetil-neuraminidase,  $\beta$ -galactosidase,  $\beta$ -glicosidase,  $\alpha$ -glicosidase e hialuronidase (quadro 2) (122). O esquema mostrou fiabilidade em vários estudos e foi assumido como método de referência (22, 75), mas é particularmente útil para identificar *S. intermedius* visto ser fenotipicamente muito distinto das outras duas espécies, (121). No entanto este método apenas identificava ao nível da espécie e, com a divisão das três espécies iniciais num maior número de unidades taxonómicas, foi sendo necessário atualizar o perfil fenotípico das novas subespécies, com as enzimas do método de referência (quadro 2). Ainda assim a confirmação da subespécie pode requerer testes moleculares (33).

No quadro 2 distinguem-se enzimas com maior ou menor poder discriminatório entre as espécies. Esta observação levou à criação do sistema “Fluo Card *Milleri*” que incluía em círculos sequenciais, os substratos para as enzimas  $\beta$ -fucosidase,  $\beta$ -glicosidase e  $\alpha$ -glicosidase, permitindo identificar as três espécies (35), mas este método mostrou algumas incongruências (105).

**Quadro 2:** Identificação de SAG e perfil fenotípico pelo método de referência.

	<i>S. anginosus</i>			<i>S. constellatus</i>				<i>S. intermedius</i>		
	W	$\beta$ – hem.	Não- $\beta$ –hem.	W	$\beta$ – hem.	Não- $\beta$ –hem.	subsp. <i>constellatus</i> subsp. <i>pharyngis</i> $\beta$ –hem.	W	$\beta$ – hem.	Não- $\beta$ –hem.
<b>Antigénio de Lancefield <sup>b</sup></b>		C,F, G,N	A,C,F, G,N		F,N	F,N	C		N	N
<b><math>\beta</math>-D-fucosidase</b>	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
<b><math>\beta</math>-N-acetil-glicosaminidase</b>	-	v	-	-	-	-	+	+	+	+
<b><math>\beta</math>-N-acetil-galactosaminidase</b>	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
<b><math>\alpha</math>-N-acetil-neuraminidase</b>	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
<b><math>\beta</math>-galactosidase</b>	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+
<b><math>\beta</math>- glicosidase</b>	+	+	+	-	-	-	+	v	v	v
<b><math>\alpha</math>-glicosidase</b>	v	-	v	+	+	+	+	+	+	+
<b>Hialuronidase</b>	-	+	-	+	+	+	v	+	+	+

Adaptado de Facklam *et al.*, 2002 (33). "N" - sem antígeno de Lancefield; "+"  $\geq 92\%$  de estirpes positivas; "-"  $\leq 8\%$  de estirpes positivas; "v" 8 a 91% de estirpes são positivas; "W" – Identificação para cada espécie segundo o esquema proposto por Whiley *et al.*, 1990 (122). Foram destacadas a cinza as enzimas utilizadas no presente trabalho.

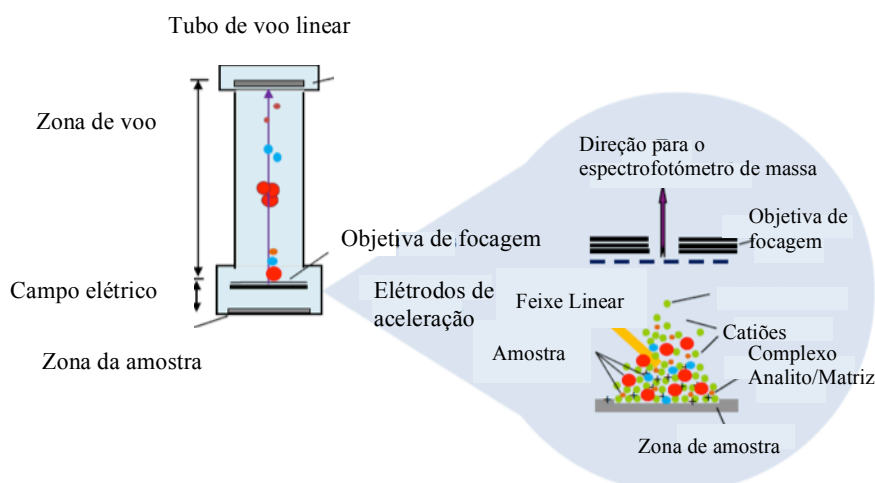
Para a identificação em laboratórios de microbiologia clínica são necessários métodos simples e por isso métodos como o sistema API e Vitek GPI (“Gram Positive Identification”) têm sido utilizados, sendo este último viável apenas para a identificação do grupo e não da espécie ou subespécie (21). O API é um sistema prático e rápido para identificação fenotípica de microrganismos com base na capacidade das estirpes degradarem certos substratos. O perfil é obtido após a avaliação de todas as reações levando a uma identificação ao nível da espécie ou subespécie. Para o género *Streptococcus* existem dois sistemas de identificação: Api 20 Strep e Rapid ID 32 Strep (bioMérieux, Marcy-l’Etoile, França). Estes foram já utilizados para SAG sendo que o primeiro não consegue distinguir ao nível da espécie ou subespécie (21, 105). Este problema foi proposto ter sido ultrapassado com o Rapid ID 32 Strep, sendo no entanto controverso se este método de identificação está de acordo com o método de referência (75, 105), podendo as divergências ser causadas pela preparação e concentração do inóculo ou pelas condições de crescimento (1).

#### **1.6.1.3 “Matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry” (MALDI-TOF-MS)**

Recentemente o sistema MALDI-TOF-MS ou apenas MALDI-TOF, que analisa a razão entre a carga e a massa de biomoléculas grandes, como proteínas ribossomais, tem apresentado resultados promissores. O princípio da técnica, ilustrado na figura 3, baseia-se na cristalização da amostra em conjunto com uma matriz, que vai posteriormente ser sujeita a curtos pulsos de laser, ionizando as moléculas constituintes. Depois de ionizadas, estas partículas são sujeitas a um campo eletromagnético, no vácuo, que acelera os iões de acordo com a sua carga e massa. É o grau de ionização e a massa das proteínas que vai determinar o seu tempo de voo (“Time of flight” – TOF), até que as partículas sejam detetadas no topo do tubo de vácuo do aparelho. O TOF origina um espectro característico de cada estirpe que, por estar sujeito a ruído inerente ao método e à variabilidade existente dentro da mesma espécie, nunca é igual entre estirpes. Este é depois comparado com os espectros inseridos na base de dados e é gerada uma pontuação baseada na semelhança entre o espectro obtido e os dez espectros mais próximos, o que permite a identificação ao nível da espécie e subespécie (127). Esta técnica é rápida e sensível permitindo, com apenas uma a duas colónias, uma identificação direta da espécie sem necessitar de pré-diferenciação como no caso do

Rapid ID 32 Strep. Tem ainda como grandes vantagens não depender do meio de cultura ou das condições de incubação nem de reações metabólicas, por isso não está vulnerável ao ganho ou perda de funções nestas vias (127).

Existem no entanto pequenas discrepâncias na diferenciação entre os testes bioquímicos, moleculares e o MALDI-TOF. Dado que atualmente este é baseado essencialmente na análise do espectro das proteínas ribossomais, os resultados são mais semelhantes aos obtidos por sequenciação de *rRNA 16S* (127). Assim, espécies que não diferem suficientemente na sua sequência proteica ribossomal incluindo alguns *Streptococcus* ou espécies em que a variação intra-espécies é mais elevada que a inter-espécies como *S. oralis* e *S. mitis* não são corretamente diferenciados por MALDI-TOF (36, 127). Todavia para SAG não foram reportados problemas e parecem ser melhor identificados do que através de outros métodos (95).



**Figura 4:** Princípio da técnica MALDI-TOF- MS, adaptado de Wieser et al., 2013 (127)

## 1.6.2 Métodos genotípicos

### 1.6.2.1 Métodos de análise de um único locus

Um vez que os métodos fenotípicos têm limitações, tais como a falha na identificação ao nível da subespécie ou a interferência das condições do inóculo e de incubação, o que pode originar fraca reprodutibilidade, a procura de métodos genotípicos é fundamental. Muitos autores testaram já a diferenciação do grupo *anginosus*, quer de outros grupos quer das espécies constituintes, utilizando diversos genes. Por outro lado, o uso de genes únicos para cada espécie ou de sequências conservadas entre as espécies

do grupo define a necessidade de, aliada à técnica de PCR, se ter que recorrer à sequenciação.

A amplificação e sequenciação de porções dos genes codificantes de *rRNA 16S* levaram também a concluir que este seria um bom método de diferenciação das três espécies (22, 71, 105). Também a sequenciação do gene *tuf* e *recN* mostrou ter bom poder discriminatório para o género *Streptococcus* e identificar separadamente as espécies de SAG (37, 105). No entanto, outros autores referiram que a identificação baseada na sequenciação de apenas um gene, leva a inconsistência na topologia das árvores filogenéticas construídas (*rRNA 16S*, *recN*, *tuf*, *rpoB* e *sodA*), podendo isto dever-se a fenómenos de recombinação, já observados em SAG (31, 37, 38, 90, 93). Contudo, em 2004 um método promissor foi apresentado por Takao *et al.*, que incluía a diferenciação ao nível da espécie e subespécie (excetuando a subespécie *viborgensis* não definida na altura), utilizando um esquema baseado apenas na técnica de PCR para a deteção de genes específicos (109).

#### 1.6.2.2 “Multilocus sequence analysis” (MLSA)

A suposta impossibilidade de identificação baseada num gene único, justificou a utilização de um conjunto de genes. A técnica de “multilocus sequence typing” (MLST) foi desenvolvida em 1998 e consiste na sequenciação de sete genes “housekeeping”, com o objetivo de tipar as estirpes de forma inequívoca, para que a caracterização possa ser facilmente comparada entre laboratórios (77). A técnica tem um grande poder discriminatório e é muito utilizada para diversas espécies estreptocócicas tanto na epidemiologia local como global. O MLST permite inferir relações de descendência e ancestralidade pela comparação dos diferentes “sequence type” (ST). Mais recentemente foi proposta a utilização de um esquema de sete genes comuns às bactérias do género *Streptococcus*, com ênfase na identificação das espécies, sendo o nome adaptado pelos autores para “multilocus sequence analysis” (MLSA). Após a concatenação das sequências alélicas de cada estirpe, é construída uma árvore filogenética. Este método, foi já utilizado na diferenciação de SAG com o objetivo não só de identificar, como de esclarecer a taxonomia deste grupo complexo de espécies (64). Neste caso, os genes utilizados são direcionados aos genes das proteínas “methionine aminopeptidase” (*map*), “pyruvate formate lyase” (*pfl*), “inorganic pyrophosphatase” (*ppac*), “RNA polymerase beta subunit” (*rpoB*), “pyruvate kinase”



(*pyk*), “superoxide dismutase” (*sodA*) e “elongation factor Tu” (*tuf*) Os resultados deste esquema mostraram coerência quando comparados com a sequenciação do *rRNA 16S* e a análise fenotípica (64).

### 1.6.2.3 “Pulsed-field gel electrophoresis” (PFGE)

Além dos métodos com base na sequenciação são também utilizados os baseados nos perfis de digestão. Na técnica de PFGE através da digestão do DNA total da bactéria, é possível comparar os perfis de bandas de DNA entre as estirpes de modo a inferir relações entre elas. Este método é capaz de detetar eventos genéticos menores que se refletem no ganho ou perda de um local de reconhecimento da endonuclease, ou na alteração relativa dos locais de reconhecimento por aquisição ou perda de material genético, ou ainda rearranjos cromossomais. Nesta técnica, o DNA total da bactéria é submetido a digestão por uma endonuclease de corte pouco frequente, dando origem a fragmentos de DNA de elevado tamanho. Para permitir uma separação eficaz em gel de agarose destes fragmentos, estes são posteriormente sujeitos a uma variante da técnica de eletroforese na qual a orientação do campo elétrico é alterada periodicamente. Os perfis obtidos neste gel podem ser comparados com recurso a “software” próprio que permite uma melhor uniformização e análise (110). Devido ao elevado poder discriminatório, resolução e reprodutibilidade é considerado o método preferencial para estudos de epidemiologia local e de deteção de surtos para muitas bactérias, sendo utilizado frequentemente como método de genotipagem nestes casos (40, 98).

Esta técnica foi já usada para SAG, com as endonucleases *SmaI* e *ApaI*, e mais uma vez foi demonstrado o elevado poder discriminatório do PFGE sendo a reprodutibilidade de 100% ainda que com uma grande diversidade genética entre os membros do grupo (10). Por PFGE as espécies *S. constellatus* e *S. intermedius* são mais semelhantes entre si do que qualquer uma das duas a *S. anginosus* e esta última espécie é a que apresenta maior diversidade. Apesar do elevado grau de polimorfismo intra-espécie, em geral as estirpes da mesma espécie são mais próximas entre si do que a estirpes de outras espécies (10).

## 1.7 Perfil de suscetibilidade a antimicrobianos

A descoberta dos agentes antimicrobianos em 1929 por Alexander Fleming teve um impacto significativo na redução da mortalidade devido a infeções bacterianas e até à década de 80 o grupo *viridans* foi considerado suscetível aos  $\beta$ -lactâmicos. No entanto,

a resistência nestes agentes cresceu rapidamente nos anos 90. Diversos estudos demonstram este aumento no grupo *viridans*, tanto para os  $\beta$ -lactâmicos como para macrólidos, lincosaminas e tetraciclina (entre outros), embora o ênfase seja nas restantes espécies do grupo que não SAG (96). Assim, embora se descreva por vezes níveis mais altos de resistência a alguns antimicrobianos como a penicilina, eritromicina, clindamicina, tetraciclina e ciprofloxacina (8, 23, 30, 39), os SAG são suscetíveis à maior parte dos antimicrobianos utilizados na prática clínica e não foram ainda descritas resistências à vancomicina, cloranfenicol, cotrimoxazole, levofloxacina, rifampicina, quinupristina-dalfopristina, gentamicina e estreptomicina (61, 76). O consumo prévio de antimicrobianos parece ser o principal factor de risco associado ao desenvolvimento de resistências (16, 67, 78).

Os antimicrobianos estão divididos em classes consoante o seu mecanismo de ação. Estirpes resistentes a pelo menos três classes de antimicrobianos são consideradas multirresistentes (2).

Os  $\beta$ -lactâmicos atuam sobre as proteínas de ligação à penicilina (PBPs) e impedem a síntese do peptidoglicano. O mecanismo de resistência a estes antimicrobianos no grupo *viridans* prende-se com a diminuição da afinidade de ligação às PBPs, por alterações nos genes que codificam estas proteínas. Estes genes foram também encontrados em *S. pneumoniae*, o que sugere que a troca genética entre estas espécies foi importante no desenvolvimento de resistência (46, 128). No entanto, está ainda por esclarecer a presença deste ou de outro mecanismo de resistência aos  $\beta$ -lactâmicos, em SAG.

Os macrólidos são inibidores da síntese proteica e a resistência a esta classe de antimicrobianos ocorre em *Streptococcus* principalmente por dois mecanismos. A alteração do alvo, que impede a ligação dos macrólidos à subunidade 23S do rRNA, torna as estirpes resistentes também a lincosamidas e a estreptograminas B e define o fenótipo  $MLS_B$ , constitutivo ou indutível, o fenótipo observado em SAG (23, 63, 96). O outro mecanismo resulta de uma bomba de efluxo que excreta o antimicrobiano do interior das células conferindo resistência apenas aos macrólidos, fenótipo M (63).

SAG enquanto parte da microbiota humana, tal como outros *Streptococcus* do grupo *viridans* naturalmente competentes, podem servir como reservatório de genes de resistência para outras bactérias que colonizem o mesmo ambiente (48, 49, 117). Podem ainda adquirir genes de estirpes do grupo *viridans* também colonizadoras, com níveis de

resistência comprovadamente mais elevados. Por tudo isto e dado a gravidade das infecções por SAG, torna-se imprescindível a correta identificação ao nível da espécie assim como a monitorização do perfil de suscetibilidade para um melhor tratamento das infecções.

### **1.8 Objetivos**

De acordo com as lacunas ainda existentes na caracterização, identificação e taxonomia do grupo SAG estes constituíram os três eixos de trabalho da presente dissertação. Assim, foram traçados os seguintes objetivos:

- Identificar as espécies e subespécies de SAG, isoladas a partir de infeção no Homem e testar a associação entre os diferentes *taxa* com grupos etários, sexo, apresentação clínica e invasibilidade;
- Determinar o perfil de resistência aos antimicrobianos de modo a guiar a terapêutica empírica destas infeções;
- Comparar os métodos bioquímicos de identificação da espécie e subespécie e avaliar a utilidade da técnica de MALDI-TOF na identificação;
- Avaliar e analisar os métodos de identificação genética com vista à escolha de um método de referência;
- Analisar a clonalidade das estirpes que causam infeção no Homem assim como a diversidade genética inter e intra-espécie e subespécie;
- Analisar a classificação e divisão taxonómica das espécies e subespécies de SAG.

---

## 2. Materiais e Métodos

---

### 2.1 Coleção de estirpes<sup>2</sup>

Para este trabalho foi pedido a laboratórios hospitalares portugueses, distribuídos por todo o país, que enviassem todas as estirpes não duplicadas de *Streptococcus* isoladas para o Instituto de Microbiologia da Faculdade de Medicina de Lisboa. No total contribuíram para este estudo 10 hospitais sendo a proveniência da maioria das estirpes o Hospital de Santa Maria (HSM). As estirpes utilizadas neste estudo tinham sido identificadas nos laboratórios hospitalares como pertencentes ao grupo SAG, apesar da espécie não vir definida a priori em todos os casos, entre 2000 e 2011. As estirpes foram classificadas como provenientes de infeções invasivas quando o agente bacteriano foi isolado a partir de amostras biológicas habitualmente estéreis e cuja colheita também foi feita de forma estéril. No caso de o microrganismo ter sido isolado de locais onde é reconhecida colonização, de locais não estéreis ou quando o procedimento de recolha de amostra pode levar à sua contaminação com a microbiota dos territórios contíguos, as estirpes foram consideradas como provenientes de infeção não invasiva. Foram incluídas no estudo todas as estirpes invasivas e foi feita uma amostragem aleatória de 100 estirpes não invasivas recebidas durante o período do estudo. Posteriormente foram acrescentadas todas as estirpes provenientes de amostras respiratórias, no sentido de aumentar a probabilidade de encontrar *S. constellatus* subsp. *pharyngis* e *S. anginosus* subsp. *whileyi* na coleção, visto serem duas subespécies minoritárias, características de infeções na nasofaringe. No total foram estudadas 213 estirpes, sendo 98 isoladas de infeção invasiva e 115 de não invasiva, distribuídas pelos produtos biológicos de acordo com o quadro 3. No caso das infeções não invasivas, houve dois doentes dos quais foram estudadas duas estirpes por pertencerem a espécies distintas.

Depois de recebidas no Instituto de Microbiologia as estirpes foram semeadas em meio constituído por “tryptic soy agar” [(TSA); (Oxoid, Hampshire, Grã-Bretanha)], suplementado com 5% de sangue de carneiro desfibrinado (ProBiológica, Belas, Portugal), e incubadas a 35°C, durante 16-24h em aerobiose com 5% de CO<sub>2</sub>. Depois de observada a estirpe em cultura pura e até à sua análise, foi conservada a -80°C em meio “tryptone soya broth” (Oxoid, Hampshire, Grã-Bretanha) com 15% de glicerol.

---

<sup>2</sup> No presente trabalho a palavra estirpe é utilizada para referir cada microrganismo isolado a partir de uma única colónia num produto biológico.

**Quadro 3:** Distribuição de produtos biológicos na amostra (n=213).

Invasivo			Não Invasivo						Total
Sangue	Líquido pleural	Líquido ascítico	Pus	Urina	LBA <sup>a)</sup>	Exsudado faríngeo	Secreções brônquicas	Outros <sup>b)</sup>	
64	11	23	90	2	2	10	3	8	213

<sup>a)</sup> Lavado bronco-alveolar. <sup>b)</sup> Outros - Exsudado ocular (n=3), expetoração (n=2), exsudado auricular (n=1), biópsia (n=1) e origem desconhecida (n=1)

## 2.2 Estirpes de referência e controlos

Ao longo de toda a metodologia de identificação foram utilizadas as estirpes de referência da coleção alemã: DSM 20563<sup>T</sup> *S. anginosus* subsp. *anginosus*, DSM 25818<sup>T</sup> *S. anginosus* subsp. *whileyi*, DSM 20573<sup>T</sup> *S. intermedius*, DSM 20575<sup>T</sup> *S. constellatus* subsp. *constellatus*, DSM 17475<sup>T</sup> *S. constellatus* subsp. *pharyngis* e DSM 25819<sup>T</sup> *S. constellatus* subsp. *viborgensis*. Estas estirpes foram utilizadas como controlos positivos ou negativos dependendo do teste em causa. No caso de controlos negativos externos ao grupo SAG serem necessários, recorreu-se a estirpes de outras espécies do género como *S. pneumoniae* ou *S. agalactiae* da coleção do Instituto de Microbiologia. Como controlo negativo não bacteriano foi utilizada água purificada pelo sistema milli-Q [Millipore, Billerica, Estados Unidos da América (EUA)].

## 2.3 Caracterização e identificação não genotípica

### 2.3.1 Hemólise

A atividade hemolítica foi registada pela observação de colónias isoladas, em TSA com 5% de sangue de carneiro desfibrinado, após 18-24h de incubação, à temperatura de 35°C, em atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub>. Na coleção invasiva foi também testada a hemólise em sangue de cavalo.

### 2.3.2 Classificação de Lancefield

Para a determinação do grupo de Lancefield foi utilizada a técnica de aglutinação com látex comercial, “Streptococcal Grouping Kit” (Oxoid, Hampshire, Grã-Bretanha). Neste kit partículas de látex previamente revestidas por anticorpos de cada grupo são utilizados para determinar o grupo de Lancefield. Brevemente, foram recolhidas do meio de cultura um conjunto de colónias correspondente ao volume de uma ansa de 1µL e foram suspensas em 30µL de enzima de extração. Após 30 minutos de incubação à temperatura de 37°C, 7µL da suspensão bacteriana foi misturada com 7µL de cada um dos soros a testar (A, C, F e G). No caso de reações negativas com os quatro soros, ou positivas concomitantemente com pelo menos dois soros, testou-se também com os

soros B e D de Lancefield. A reação de aglutinação ocorreu normalmente ao fim de 30 segundos e, foi registada como positiva se ocorreu até 1 minuto após a adição do soro, sendo considerada como um resultado negativo se não se observava aglutinação até esta altura (segundo instruções do fabricante).

### 2.3.3 Sistema de identificação Rapid ID 32 STREP

As 32 cúpulas que constituem a galeria Rapid ID 32 STREP (bioMérieux, Marcy-l'Etoile, França) contêm substratos que permitem a pesquisa de enzimas específicas assim como a determinação da capacidade de fermentação de hidratos de carbono. Este sistema testa a produção das enzimas: Arginina dihidrolase (ADH),  $\beta$ -glicosidase ( $\beta$ GLU),  $\beta$ -galactosidase ( $\beta$ GAR e  $\beta$ GAL),  $\beta$ -glucuronidase ( $\beta$ GUR),  $\alpha$ -galactosidase ( $\alpha$ GAL), fosfatase alcalina (PAL), alanil-fenilalanil-prolina arilamidase (APPA), arilamidase de ácido piroglutâmico (PyrA), *N*-acetil- $\beta$ -glucosaminidase ( $\beta$ NAG), glicil-triptofano arilamidase (GTA),  $\beta$ -manosidase ( $\beta$ MAN) e urease (URE). Testa ainda a reação de Voges-Proskauer (VP), a hidrólise do hipurato (HIP), e a acidificação de ribose (RIB), manitol (MAN), sorbitol (SOR), lactose (LAC), trealose (TRE), rafinose (RAF), sacarose (SAC), L-arabinose (LARA), D-arabinol (DARL), ciclodextrina (CDEX), glicogénio (GLYG), pululano (PUL), maltose (MAL), melibiose (MEL), melezitose (MLZ), metil-  $\beta$ -D-glucopiranosido (MBDG) e tagatose (TAG)<sup>3</sup>.

Os testes foram realizados segundo as indicações do fabricante. As estirpes foram incubadas durante 48 horas em jarras de anaerobiose com o sistema de geração de gás “GasPak EZ” (BD, Becton, Dickinson and Company, New Jersey, EUA), em gelose Columbia [(CBA) (Oxoid, Hampshire, Grã-Bretanha)] suplementado com 5% de sangue de carneiro. Esta cultura foi seguidamente inoculada em tubos de vidro com 4 mL de água estéril bidestilada de modo a obter uma suspensão com uma opacidade de 4 McFarland, avaliada com o densitómetro “DENSIMAT” (bioMérieux, Marcy-l'Etoile, França). Em cada cúpula da galeria foi de imediato inoculado 55  $\mu$ L desta solução. Depois de incubada a 37°C em atmosfera aeróbia entre 4 h e 4 horas e 30 minutos, foi efetuada a leitura. Para tal adicionaram-se os reagentes VPA, VPB, FB e NIN nas cúpulas indicadas, recorrendo-se ao fim de 5 a 10 minutos ao sistema automático *mini API*® atualizado com a versão Rapid ID 32 Strep 3.0. O perfil de reações positivas e

<sup>3</sup> A abreviatura que segue cada uma das enzimas ou reações corresponde ao nome abreviado do substrato respetivo, tal como representado na galeria API.

negativas permite a obtenção de um perfil numérico interpretado pelo “software”, que faculta a identificação e respetiva percentagem, ou seja, uma estimativa da proximidade do perfil obtido ao do *taxon* mais próximo presente na base de dados. Quando esta não é suficientemente elevada são sugeridos outros *taxa* de possível identificação com percentagens inferiores. Todos os testes foram sujeitos a leitura automática do sistema (LA) sem qualquer intervenção, e a leitura totalmente manual (LM) segundo o sistema de cores e indicações do fabricante, utilizando apenas o software para cruzamento do perfil obtido com a base de dados e posterior resultado.

### 2.3.4 MALDI-TOF MS

Todas as estirpes foram sujeitas a MALDI-TOF segundo as indicações do fabricante. Após cultura semelhante à utilizada para as galerias API, todo o procedimento foi efetuado por técnicos laboratoriais familiarizados com o protocolo pertencentes ao Serviço de Patologia Clínica do HSM. Sucintamente, 1 a 4 colónias (em função do tamanho), foram colocadas na base de aço e misturadas com 1µL da solução matriz cristalizando em conjunto após 5 a 10 minutos de secagem à temperatura ambiente. A placa foi colocada dentro do aparelho de MALDI-TOF (microflex, Bruker<sup>®</sup> Corporation, Alemanha). O espectro obtido foi comparado com os espectros das estirpes da base de dados (versão 3.3.1.1, quadro 4) através do software MALDI Biotyper (versão 3.0), originando uma pontuação, entre 0,000-3,000, que fornece informação sobre a validade da identificação em relação a cada estirpe comparada, tal como representado no quadro 5. O *taxon* com valor superior foi considerado a identificação proposta pela técnica para cada estirpe. Em estirpes com identificação inferior a 1,700, foi repetida a análise embora nalguns casos o resultado se tenha mantido.

**Quadro 4:** Estirpes de SAG presentes na base de dados de MALDI-TOF, versão 3.3.1.1, Bruker<sup>®</sup> Corporation, Alemanha.

<i>Taxon</i>	Estirpes na base de dados do MALDI-TOF - Bruker
<i>S. anginosus</i> subsp. <i>anginosus</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• DSM20563<sup>T</sup> – <i>S. anginosus</i> subsp. <i>anginosus</i><sup>4</sup></li> <li>• 0807M10067501 IBS</li> </ul>
<i>S. intermedius</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• DSM20573<sup>T</sup> – <i>S. intermedius</i></li> </ul>
<i>S. constellatus</i> subsp. <i>constellatus</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• DSM20575<sup>T</sup> – <i>S. constellatus</i> subsp. <i>constellatus</i></li> </ul>
<i>S. constellatus</i> subsp. <i>pharyngis</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• DSM20575<sup>T</sup> – <i>S. constellatus</i> subsp. <i>pharyngis</i></li> </ul>

<sup>4</sup> A estirpe DSM20563<sup>T</sup>, quando referida pelo “software” é identificada como *S. anginosus*. Isto porque apenas no início de 2013 ocorreu a divisão desta espécie em duas subespécies, *S. anginosus* subsp. *anginosus* e *S. anginosus* subsp. *whileyi*, passando a anterior estirpe de referencia da espécie *S. anginosus* a representar agora apenas *S. anginosus* subsp. *anginosus*.

**Quadro 5:** Sistema de pontuações atribuídas pelo software do MALDI-TOF, Bruker® Corporation, Alemanha, adaptado.

Intervalo	Descrição	Símbolos
2,300 ... 3,000	Identificação com grande probabilidade ao nível da espécie	(+++)
2,000 ... 2,299	Identificação segura ao nível do gene, identificação provável da espécie	(++)
1,700 ... 1,999	Identificação provável no género	(+)
0,000 ... 1,699	Identificação não fiável	(-)

### 2.3.5 Atividade enzimática

Através do teste da capacidade de degradação enzimática pretendeu-se aplicar o método de referência para a identificação das estirpes em estudo. No entanto, selecionaram-se para este método os cinco substratos que permitiam uma melhor diferenciação entre os *S. anginosus*, *S. intermedius*, *S. constellatus* subsp. *constellatus* e *S. constellatus* subsp. *pharyngis* segundo Facklam *et al.* (33) (quadro 2).

De acordo com o quadro 2, as únicas enzimas comuns a todos as estirpes de *S. constellatus* subsp. *constellatus* são a hialuronidase e  $\alpha$ -glicosidase das quais se escolheu a segunda. No entanto, como algumas estirpes de *S. anginosus* também possuem esta enzima incluiu-se  $\beta$ -glicosidase para esta diferenciação. *S. intermedius* e *S. constellatus* subsp. *pharyngis* são capazes de produzir ambas e por isso foi acrescentada  $\beta$ -N-fucosidase e  $\beta$ -N-acetil-galactosaminidase, positivas apenas para estes dois últimos *taxa*, para uma separação segura dos primeiros. Por fim, a distinção de *S. constellatus* subsp. *pharyngis*, e *S. intermedius* foi feita através da  $\alpha$ -N-acetil-neuraminidase, única enzima diferenciadora destes dois *taxa*. No caso do conjunto das cinco reações testadas não corresponder a nenhum dos fenótipos apresentados não foi obtida uma identificação por este método. Assim, o conjunto final de enzimas utilizado foi  $\beta$ -N-acetil-galactosaminidase,  $\beta$ -N-fucosidase,  $\alpha$ -glicosidase,  $\beta$ -glicosidase e  $\alpha$ -N-acetil-neuraminidase, testadas a partir da degradação dos substratos fluorogénicos respetivos: 2'-4 metil-umbeliferil(4MU)-N-acetil- $\beta$ -D-galactosaminida ( $\beta$ -NAGA), 4-MU- $\beta$ -D-fucosídeo ( $\beta$ -FUC), 4-MU- $\alpha$ -D-glicosídeo ( $\alpha$ -GLU), 4-MU- $\beta$ -D-glicosídeo ( $\beta$ -GLU) e ácido 4-MU- $\alpha$ -D-N-acetil-neuramínico ( $\alpha$ -ANA), (Sigma-Aldrich Química, Portugal). Estes substratos foram diluídos num volume mínimo de DMSO (dimetilsulfóxido) e posteriormente em TES 50mM [ácido N-[Tris(hidroximetil)metil]-2-amino-etano-sulfónico (Sigma-Aldrich Química, Portugal)] a pH 7,5 até uma concentração de 100 $\mu$ g/mL. As estirpes foram semeadas em TSA e incubadas durante 24 a 48 horas a 35°C com 5% de CO<sub>2</sub>. De seguida efetuaram-se suspensões bacterianas em tampão TES ajustando a turbidez para 1 McFarland. Em placas de 96 poços juntou-



se 20µL de cada substrato a testar com 50 µL de cada suspensão bacteriana. O tempo de incubação foi otimizado e a degradação do substrato foi visível após 1 segundo de exposição à luz ultravioleta (AlphaImager HP versão 6.0.0, Innotech Corporation, Japão). As reações foram consideradas positivas por avaliação visual (incluindo as reações fracas mas acima do controlo negativo) ou negativas.

### **2.3.6 Presença dos fatores de virulência: hialuronidase e sulfatase da condroitina**

Segundo o esquema apresentado por Grinwis *et al.* (2010), o teste da presença dos dois fatores de virulência e do antigénio de Lancefield pode levar a uma identificação precisa ao nível da subespécie, com recurso apenas a testes fenotípicos (43). A produção de hialuronidase e sulfatase da condroitina pode ser testada em meio sólido com o substrato incorporado tal como testado no presente estudo e segundo o método descrito por Smith *et al.* (103). Neste método prepara-se o meio de cultura com o substrato incorporado da seguinte forma: ao meio base, “Brain Heart Infusion Broth” [(BHI), (BD, New Jersey, EUA)], é adicionado 1% de agar (Oxoid, Hampshire, Grã-Bretanha). Depois de autoclavado, e do arrefecimento até cerca de 50°C, é acrescentada uma solução aquosa de albumina bovina fração V numa concentração final de 1% e o substrato a testar: sulfato de condroitina de cartilagem de tubarão ou ácido hialurónico de *S. pyogenes* (Sigma-Aldrich química, Sintra, Portugal). Estes substratos, previamente esterilizados com filtros de 0,2 µm (Firilabo, Maia, Portugal) são acrescentados ao meio, em agitação, numa concentração de 400 µg/mL. O meio é distribuído prontamente em placas, de forma a dar uma espessura de três a quatro mm (15 mL). Após solidificadas, as placas foram conservadas a 4°C para originar uma superfície firme para sementeira.

As condições de incubação assim como a densidade do inóculo foram otimizadas durante o procedimento. Depois de preparada a suspensão de cada estirpe, foi inoculada na placa com o substrato incorporado, e as placas incubadas. Estas foram reveladas com ácido acético a 2 M durante 10 minutos. A presença de condroitina ou ácido hialurónico no meio permite a conjugação destes substratos com a albumina também presente no meio. Este conjugado vai precipitar com o ácido acético, tornando o meio opaco. Na presença do fator de virulência estes despolimerizam o substrato, impedindo por isso a formação do conjugado e a consequente opacidade do meio em torno das colónias produtoras deste fator. Forma-se um halo claro em torno das estirpes produtoras da enzima, em contraste com as zonas não inoculadas da placa que permanecem opacas.

## 2.4 Métodos de identificação e tipagem genotípica

### 2.4.1 Obtenção do DNA cromossômico

As estirpes semeadas em TSA com 5% de sangue de carneiro foram incubadas a 35°C, em atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub>, durante 24 horas, ou em casos de estirpes com colônias mais pequenas, 48 horas. Após este período retirou-se o volume correspondente a uma ansa de 1 µL para um “eppendorf” com 50 µL de água estéril bi-destilada, que foi depois colocado em banho seco a 100°C durante 10 minutos.

### 2.4.2 Reagentes e termocicladores

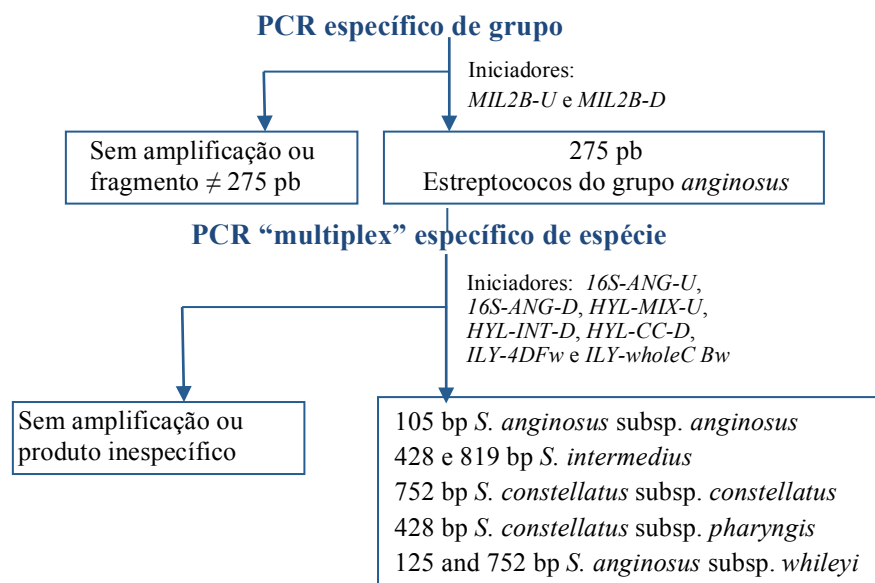
As reações de PCR apresentadas neste trabalho foram efetuadas utilizando água purificada pelo sistema milli-Q (Millipore, Billerica, EUA) e posteriormente esterilizada, enzima de polimerização de DNA Taq (Promega, Madison, EUA) e tampão adequado para esta enzima (Green GoTaq® Flexi Buffer), oligonucleotídeos iniciadores (Invitrogen, Pasley, Escócia), mistura de desoxiribonucleotídeos trifosfatados [(dNTPs) (Fermentas, Vilnius, Lituânia)] e cloreto de magnésio (MgCl<sub>2</sub>). Para as reações de amplificação recorreu-se ao termociclador da marca BioRad, modelo MyCycler Thermal Cycler (Munique, Alemanha) ou ao termociclador da marca Biometra, modelo TGradient 96, (Goettingen, Alemanha).

### 2.4.3 Identificação da espécie e subespécie por PCR

Dado que os estudos dos métodos fenotípicos revelavam algumas incongruências, optou-se pela utilização de um método genotípico enquanto “gold standard”. Escolheu-se o PCR por ter apresentado a necessária sensibilidade e especificidade nos estudos que o utilizaram (106, 109) e por conseguir separar inequivocamente os quatro *taxa* descritos à data de início do estudo e ainda *S. anginosus* subsp. *whileyi*.

A identificação por PCR foi feita em dois passos tal como mostra a figura 4. Numa primeira abordagem a reação permite saber se a estirpe em estudo pertence a SAG. Para tal usaram-se sequências iniciadoras específicas para o grupo (MIL2B-U e MIL2B-D) para uma porção parcial do gene da proteína 2B de ligação à penicilina (gene *pbp2b*) tal como descrito por Takao *et al.* (109). No segundo passo uma identificação da espécie e subespécie é conseguida através de uma reação de PCR otimizada em *multiplex* que inclui os iniciadores: *16S-ANG-U*, *16S-ANG-D* para o gene *rRNA 16S* de ambas as subespécies de *S. anginosus*; *ILY-4DFw* e *ILY-wholeC Bw*, para a intermedilicina de *S.*

*intermedius*; e por fim para a hialuronidase de *S. intermedius* e *S. constellatus* subsp. *pharyngis* os iniciadores *HYL-MIX-U* e *HYL-INT-D*, sendo que o primeiro em conjunto com *HYL-CC-D* amplificam a hialuronidase de *S. constellatus* subsp. *constellatus*. As quantidades utilizadas de cada reagente, em cada mistura de reação, estão indicadas no quadro 6. As sequências oligonucleotídicas iniciadoras encontram-se no quadro 26, e os programas de PCR utilizados estão descritos no quadro 27, ambos em anexo.



**Figura 4:** Esquema de PCR utilizado para a identificação do grupo, espécie e subespécie. Adaptado de Takao *et al.* 2004 (109).

**Quadro 6:** Volumes e concentrações utilizadas de cada reagente na mistura reacional para PCR.

Reagentes	Iniciadores <i>MIL2B</i>	Multiplex: <i>HYL</i> , <i>ILY</i> e <i>rRNA 16S</i>	<i>map</i> , <i>pfl</i> , <i>ppaC</i> , <i>puk</i> , <i>rpoB</i> , <i>tuf</i>	<i>sodA</i>
Água	12,5 µL	10,1 µL	32,35 µL	26,8 µL
Tampão (5X)	4 µL	4 µL	10 µL	10 µL
MgCl <sub>2</sub> 25mM	1,2 µL	1,6 µL	3 µL	3 µL
dNTP's 10mM	0,4 µL	0,4 µL	1 µL	1 µL
Oligonucleotídeos iniciadores 10µM	0,4 µL	0,4 µL	1 µL	2 µL
Polimerase de DNA Taq (5 U/µL)	0,1 µL	0,1 µL	0,15 µL	0,2 µL
DNA	1 µL	1 µL	1,5 µL	5 µL
Volume total	20 µL	20 µL	50 µL	50 µL

#### 2.4.4 MLSA

O MLSA, realizado apenas na coleção de estirpes invasiva, teve como genes alvo os fragmentos internos dos genes *map*, *pfl*, *ppaC*, *pyk*, *rpoB*, *sodA* e *tuf* tal como descrito por Bishop *et al.* (14). Utilizaram-se os oligonucleotídeos iniciadores deste autor exceto para *sodA*, dado que mesmo após otimizações sucessivas originaram fragmentos de amplificação inespecífica. Assim, para *sodA*, foram adotados os oligonucleotídeos

iniciadores descritos por Poyart *et al.* (2002) (94). As quantidades utilizadas de cada reagente, em cada mistura de reação, estão indicadas no quadro 6. As sequências oligonucleotídicas iniciadoras encontram-se no quadro 26, e os programas de PCR utilizados estão descritos no quadro 27, ambos em anexo.

#### **2.4.5 Eletroforese em gel de agarose**

Todos os produtos de PCR foram sujeitos a análise por migração em gel de agarose, na presença de um campo elétrico. Aliquotas de 5 µL da solução de DNA foram carregadas em gel de agarose 1% (m/V) e tampão Tris-Borato-EDTA (TBE) 0,5X (V/V) (BioRad, Hercules, EUA) com 0,5 µg/mL de brometo de etídeo, usando como marcador de tamanho molecular “1 kb plus” (Invitrogen, Carlsbad, EUA) preparado em tampão de corrida a 6X (Fermentas, Vilnius, Lituânia) e água milli-Q. O gel foi fotografado usando o sistema EDAS 290 (Eastman Kodak Company, Nova Iorque, EUA).

##### **2.4.6.1 Purificação, sequenciação e análise das sequências para MLSA**

A purificação dos produtos de PCR para sequenciação foi feita utilizando sistemas de purificação de DNA comerciais, de acordo com as instruções do fabricante. Para purificação em placa de 96 poços foi utilizado o sistema “Montage SEQ<sub>96</sub>, Sequencing Reaction Cleanup Kit” (Millipore corporation, USA). Para um número de amostras inferior foi usado o sistema de purificação em tubo “High Pure PCR Product Purification Kit” (Roche, Alemanha). O DNA purificado e os iniciadores correspondentes foram enviados para a empresa Macrogen (Amesterdão, Holanda) para ser sequenciado. As sequências foram sujeitas a análise com recurso ao programa “Bionumerics” (Applied-Maths, Sint-Martens-Latem, Bélgica, versão 7.1). Sequências internas de cada um dos genes foram utilizadas para comparação (64), cujos tamanhos constam no quadro 26 (anexo). Em primeiro lugar foi feita uma análise de perfis alélicos igual à aplicada em MLST. Assim, foi dada uma numeração sequencial a todos os alelos de cada gene das estirpes já publicadas por Jensen *et al.* (64). De seguida estas foram comparadas com a coleção de estirpes invasivas, utilizando os programas “MEGA” e “Geneious” e, sempre que necessário definiram-se novos alelos. Por fim, analisou-se o perfil dos 7 genes e foram designados STs. Estes dados foram analisados através do programa PHYLOViZ para construção do diagrama através do algoritmo goeBURST Full MST (“minimum spanning tree”). Neste algoritmo as sequências alélicas resultantes da diversificação clonal serão variantes do fundador que diferem

num dos sete *loci* examinados por MLST (“single locus variant”, SLV). Subsequentemente, SLVs podem diversificar em DLVs (“double locus variants”) e estes em TLVs (“triple locus variants”), e assim sucessivamente (34). De seguida, para garantir que a árvore apresentada é única, em caso de empate entre ligações possíveis entre STs, é escolhida a ligação ao ST com mais SLVs por ser provavelmente o mais ancestral e clone fundador, seguido de DLVs, e assim por diante. Se ainda empatado, a ligação é feita ao ST mais frequente nos dados. A última regra de desempate é baseada no identificador do ST, sendo escolhido o ST de número inferior pois possivelmente estará há mais tempo na base de dados e por isso poderá ser mais antigo na população. As sequências foram também concatenadas, à semelhança do realizado por Jensen *et al.* (64), seguindo-se a construção de árvores filogenéticas de MLSA com recurso ao programa “MEGA” e ao algoritmo de “minimal evolution”, com o método de “bootstrap” com 1000 replicações e o modelo de evolução de Kimura de 2-parâmetros.

## 2.5 Análise estatística

Para comparação da presença de um fenótipo em *taxa* distintos e a força da associação entre dois valores de dados binários, decorrentes da análise, calculou-se o “odds ratio” (OR). Utilizou-se o método exato de Fisher bilateral (p) para determinar significâncias estatísticas e corrigiram-se os valores para a taxa de descoberta de falsos positivos (“False Discovery Rate”, FDR) (12). Os valores de OR, os intervalos de confiança (IC) a 95%, e os valores p e FDR foram determinados utilizando as bibliotecas “epitools” e “multitest” do programa informático “R”. Para analisar a diversidade de uma população utilizou-se o índice de diversidade de Simpson (SID), que indica a probabilidade de duas estirpes, escolhidas aleatoriamente de uma população, serem de tipos diferentes (18). A congruência entre dois métodos de identificação, ou a associação entre os alelos de determinado gene e o *taxon* a que pertencem as estirpes foi comparada pelo coeficiente de “Adjusted Wallace” (AW). Este calcula a probabilidade de duas estirpes agrupadas no mesmo *taxon*, terem o mesmo alelo, corrigido para a frequência esperada em caso de independência (99). Os intervalos de confiança a 95% (IC95) dos coeficientes de AW foram igualmente calculados. Estas ferramentas encontram-se disponíveis em [www.comparingpartitions.info](http://www.comparingpartitions.info).

## 2.6. Análise da diversidade genética por PFGE

A metodologia para preparação e digestão dos discos de DNA resultou da adaptação de um protocolo previamente descrito para *S. agalactiae* (82) e realizou-se em 4 passos: a) preparação de discos de DNA; b) digestão dos discos com endonuclease de corte pouco frequente; c) eletroforese em campo pulsado; d) análise dos perfis genómicos.

### a) Preparação dos discos de DNA

A preparação do DNA bacteriano consiste na imobilização deste em discos de agarose. As estirpes foram semeadas em TSA com 5% de sangue de carneiro seguido de incubação a 35°C, com de 5% de CO<sub>2</sub>. Após 18 a 24 h de incubação inoculou-se em 5 mL de meio líquido “Todd Hewitt” (Difco Laboratories, Detroit, EUA) e incubou-se a 35°C sem CO<sub>2</sub> durante 15 a 17 horas. Para concentração e lavagem das suspensões bacterianas, foram realizados passos de centrifugação e ressuspensão em tampão TEN (Tris 0,1M pH 7,5; EDTA 0,1M pH 7,5; NaCl 0,15M). Seguidamente transferiu-se a suspensão para um microtubo de 1,5 mL, onde foram centrifugados a 18000 g, durante 5 minutos, a 4°C (*Eppendorf* 5417R, Hamburg, Alemanha). Removeu-se de novo o sobrenadante e ressuspendeu-se em 200µL de tampão TEN. Seguiu-se um procedimento de ajuste da concentração celular antes da imobilização nos discos em agarose. Para tal determinou-se a concentração celular por medição da OD<sub>620nm</sub> num espectrofotómetro (Helios, Unicam, Cambridge, Grã-Bretanha) e ajustou-se para OD=5 com o volume de TEN adequado, de modo a obter cerca de  $7,5 \times 10^9$  ufc/mL. De seguida procedeu-se à inclusão das bactérias em agarose e obtenção dos discos. Para tal 150 µL de cada suspensão bacteriana foi equilibrada para 41°C, em novos microtubos, aos quais se adicionou igual volume de agarose com baixo ponto de fusão [“low melting point” - (LMP agarose), Bio-Rad, Califórnia, EUA] a 1,5% (p/v), previamente equilibrada com tampão PIV (Tris 0,01 M, pH 7,5; NaCl 1 M) à mesma temperatura. Aliquotas de 20 µL foram pipetadas para uma placa de vidro onde as gotas formadas foram cobertas com lâminas de microscopia para dar a forma de disco. O conjunto foi colocado a -20°C durante 5 minutos, para solidificar as gotas que por fim foram transferidas para um tubo de 15mL. A este tubo foi adicionado 1 mL do tampão de lise EC-lysis constituído por tampão EC [Tris 6 mM, pH 7,5; EDTA 0,1M pH 7,5; NaCl 1M; ácido desoxicólico 5mM; n-laurilsarcosina 17mM; Brij 58 (polioxietileno 20 cetil éter 0,5% (p/v)], lisozima a 0,67mg/ml, ribonuclease A a 33,3µg/ml (RNAse A) e mutanolisina a 5 U/mL

(Sigma-Aldrich Química, Sintra, Portugal). Incubou-se depois durante 4 a 5 horas numa estufa a 35°C, período após o qual a solução de lise foi substituída por solução ESP [EDTA 0,5 M, pH 9; n-lauril sarcosina 1% (p/v) contendo proteinase K 0,5 mg/mL (Roche, Mannheim, Alemanha)]. Depois de incubação a 50°C durante 17 a 24 horas removeu-se o tampão ESP e adicionou-se 13 ml tampão TE 1x (Tris 1 M, pH 7,5; EDTA 0,5 M, pH 8). Este procedimento de lavagem dos discos foi feito à temperatura ambiente com agitação durante 1 hora e repetido pelo menos 2 vezes. Os discos foram armazenados a 4°C em TE 1x até à realização da digestão.

#### **b) Digestão dos discos com endonuclease**

Procedeu-se à digestão do DNA total com uma endonuclease de corte pouco frequente, SmaI ou no caso de digestão incompleta, possivelmente devido à metilação no local de corte, o seu isosquisómero Cfr9I (Fermentas, Vilnius, Lituânia), que reconhece a mesma sequência mas noutra local. Para tal, um disco de agarose de cada estirpe foi transferido para microtubo de 1,5 mL, que foi equilibrado à temperatura de digestão (30°C para SmaI e 37°C para Cfr9I), em tampão aconselhado pelo fabricante, durante 1 hora. Após remoção do tampão, no caso da SmaI foi adicionada solução de digestão contendo 15U de SmaI em tampão Tango 1X, num volume total de 45 µL e a mistura foi incubada durante a noite. No caso da endonuclease Cfr9I a solução de restrição continha 7,5U num volume total de 20 µL, em tampão próprio (Fermentas, Vilnius, Lituânia).

#### **c) Eletroforese em campo pulsado**

Os fragmentos de DNA cromossómico gerados pela ação das endonucleases foram separados por eletroforese em campo pulsado. Os discos, assim como o marcador de tamanho molecular “Lambda ladder PFGE marker” (New England BioLabs, Beverley, EUA), foram introduzidos nos poços de um gel de agarose 1% (p/v) em tampão TBE 0,5x (BioRad, Munique, Alemanha) e os poços selados com a mesma agarose de modo a evitar que os discos saíssem do gel no decorrer da experiência.

Colocou-se o gel no aparelho de eletroforese (CHEF-DRIII® System, BioRad, Richmond, EUA) contendo tampão TBE 0,5x. A separação foi efetuada à temperatura constante de 14°C, durante 23 h, com uma voltagem de 6 V/cm. O intervalo de variação dos pulsos inicial e final foi de 5 e 35 segundos, respetivamente. Finalizada a corrida, o gel foi corado numa solução de brometo de etídio 0,1% (Sigma-Aldrich, Steinheim,

Alemanha), num volume de 400 mL durante pelo menos 3 horas. Após esse período fotografou-se o gel com recurso a um transiluminador de ultravioleta e ao sistema de captação de imagem (EDAS 290, Eastman Kodak Company, Nova Iorque, EUA).

#### d) Análise dos perfis de restrição

A análise e comparação dos perfis genómicos obtidos para as diferentes estirpes foi efetuada recorrendo ao *software* informático BioNumerics (Applied-Maths, Sint-Martens-Latem, Bélgica). Assim, construíram-se dendrogramas utilizando o coeficiente de Dice, com as definições de otimização e tolerância de 1,0 e 1,5%, respetivamente, e o método de agrupamento hierárquico “unweighted pair group method with arithmetic means” (UPGMA). As estirpes foram consideradas como pertencendo ao mesmo clone quando apresentavam perfis de PFGE relacionados em pelo menos 80%, como anteriormente descrito para *S. pneumoniae* (17, 98).

### 2.7 Determinação da suscetibilidade aos antimicrobianos

No presente estudo foi testada a suscetibilidade das estirpes de SAG a um painel composto por 15 antimicrobianos, de diferentes classes (quadro 7), dependendo a escolha destes da sua utilização clínica, importância como marcadores de resistência e no facto de possibilitar a comparação com estudos anteriores. Determinou-se a suscetibilidade aos antimicrobianos com recurso ao método de Kirby-Bauer de difusão em disco, utilizando-se discos preparados comercialmente (Oxoid, Hampshire, Grã-Bretanha). No caso da levofloxacina, cefotaxima, clorafenicol, quinupristina-dalfopristina, ceftriaxona, gentamicina, estreptomina e cotrimoxazole, sempre que o valor obtido representou um perfil intermédio ou resistente, foi confirmado com E-test (bioMérieux, Marcy-l'Etoile, França). A carga utilizada para cada antimicrobiano assim como a interpretação dos resultados, foi baseada nas recomendações do “clinical and laboratory standards institute” (CLSI) (24), excetuando o caso da penicilina e imipenemo no qual foram seguidas as recomendações do “european committee on antimicrobial susceptibility testing” (EUCAST) (32).

**Quadro 7:** Antimicrobianos utilizados no presente estudo e respetiva classe.

Antimicrobiano	Classe	Antimicrobiano	Classe
Penicilina (P)	$\beta$ -lactâmicos (Penicilinas)	Clorafenicol (C)	Clorafenicol
Cefotaxima (CTX)	$\beta$ -lactâmicos (Cefalosporinas)	Vancomicina (VA)	Glicopéptidos
Ceftriaxona (CRO)	$\beta$ -lactâmicos (Cefalosporinas)	Linezolid (LZD)	Oxazolidinonas
Imipenemo (IMP)	$\beta$ -lactâmicos (Carbapnemos)	Quinupristina/ dalfopristina (QD)	Streptograminas
Eritromicina (E)	Macrólidos	Gentamicina (CN)	Aminoglicosídeo
Clindamicina (DA)	Lincosamidas	Estreptomina (S)	Aminoglicosídeo
Tetraciclina (TE)	Tetraciclinas	Cotrimoxazole [(SXT)	Sulfonamidas
Levofloxacina (LEV)	Fluoroquinolonas	(trimethoprim/sulfamethoxazole)]	



### **2.7.1 Difusão em disco**

As estirpes foram semeadas em TSA com 5% de sangue de carneiro e incubadas em atmosfera enriquecida com 5% de CO<sub>2</sub>, durante 24h ou, nos casos de estirpes formadoras de colónias mais pequenas, 48 horas. Para este procedimento foram preparadas placas com meio de cultura Mueller-Hinton [(MH) (Oxoid, Hampshire, Grã-Bretanha)], suplementado com 5% (v/v) de sangue de carneiro desfibrinado (Probiológica, Belas, Portugal), de acordo com as normas CLSI. Quando seguidas as normas EUCAST o meio foi preparado do mesmo modo, à exceção da utilização de sangue de cavalo desfibrinado (Probiológica, Belas, Portugal) e do suplemento com 20mg/L de  $\beta$ -NAG. De acordo com ambas as normas de interpretação, fez-se uma suspensão das estirpes em NaCl (0,85%) de modo a obter uma turbidez de 0,5 McFarland. Com recurso a uma zaragatoa a suspensão foi depois semeada, cobrindo toda a placa em três direções distintas, em placas de MH. De seguida foram colocados os discos de papel de filtro, contendo uma concentração conhecida do antibiótico a testar e após um período de incubação de 20 a 24 horas a 35°C com 5% de CO<sub>2</sub>, mediram-se os diâmetros dos halos de inibição com o auxílio de uma régua.

### **2.7.2 E-teste**

O procedimento é semelhante ao método de difusão em disco, no entanto após semeadas as placas, coloca-se uma tira de E-teste contendo um gradiente de concentrações de antibiótico a testar. Após o mesmo período e condições de incubação mede-se o valor de MIC (“minimal inhibitory concentration”), definido pelo valor mais baixo no qual já não se observa crescimento.

### **2.7.3 Fenótipos de resistência aos macrólidos**

Os fenótipos de resistência aos macrólidos foram determinados com base na suscetibilidade das estirpes à eritromicina e à clindamicina, segundo as normas CLSI. Deste modo, as estirpes que não apresentaram suscetibilidade a ambos os antibióticos foram classificadas com fenótipo MLS<sub>B</sub>, as estirpes não suscetíveis apenas à eritromicina com o fenótipo M e as estirpes cujo halo de suscetibilidade à clindamicina era distorcido, tomando a forma de “D”, na proximidade da eritromicina, com o fenótipo iMLS<sub>B</sub>.

### 3. Resultados

#### 3.1 Identificação das estirpes

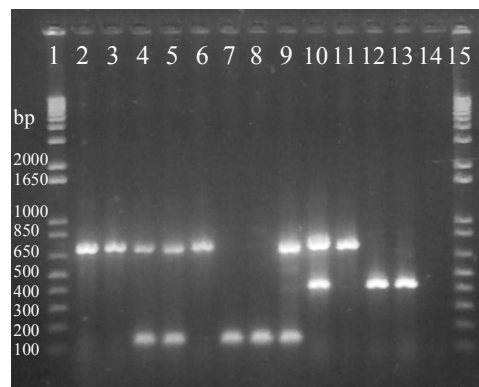
Como referido na seção 3.3.1.4, foi considerado como “gold standard” o PCR (figura 4). Na nossa coleção 213 estirpes foram identificadas ao nível do grupo, espécie e subespécie. No entanto, com este método três estirpes (não contabilizadas) obtiveram amplificações inespecíficas, tendo sido o teste repetido. No primeiro caso houve amplificação com os iniciadores específicos de grupo, embora o fragmento fosse inferior ao esperado, sem amplificação posterior com os iniciadores da reação “multiplex”. Nos outros dois casos, apesar de não ter havido amplificação com os iniciadores *MIL2B* houve posterior amplificação com os iniciadores específicos de *taxon* sendo que num caso, o fragmento amplificado tinha tamanho correspondente ao fragmento do gene da hialuronidase de *S. constellatus* subsp. *pharyngis* e *S. intermedius*. No outro caso existiam dois fragmentos mas que não correspondiam a nenhum dos tamanhos esperados. Contudo, não havendo amplificação com os iniciadores específicos de grupo ou de espécie, estas estirpes não pertencem ao grupo SAG e não foram por isso contabilizadas ou analisadas com os restantes métodos.

A coleção analisada era constituída por 98 estirpes invasivas e 115 estirpes não invasivas, distribuídas pelos *taxa* do grupo de acordo com os dados do quadro 8.

**Quadro 8:** Distribuição da amostra pelos *taxa* de SAG

	Invasivas	Não invasivas	Estirpes tipo
<b>S.a.a</b>	50	68	DSM20563 <sup>T</sup>
<b>S.a.w</b>	2	3	DSM25818 <sup>T</sup>
<b>S. i</b>	6	1	DSM20573 <sup>T</sup>
<b>S.c.c</b>	38	37	DSM20575 <sup>T</sup>
<b>S.c.ph</b>	2	6	DSM17475 <sup>T</sup>
<b>Total</b>	98	115	

S.a.a - *S. anginosus* subsp. *anginosus*, S.a.w - *S. anginosus* subsp. *whileyi*, S.i. - *S. intermedius*, S.c.c - *S. constellatus* subsp. *constellatus*, S.c.ph - *S. constellatus* subsp. *pharyngis*



**Figura 5:** Fotografia de gel de agarose de PCR em “multiplex”. Pistas (P) 2-7 estirpes sujeitas a análise: P2, P3 e P6 identificadas como S.c.c; P4 e P5 identificadas como S.a.w; P7 identificado como S.a.a. P8-13 controlos positivos das estirpes de referência DSM20563<sup>T</sup>, DSM25818<sup>T</sup>, DSM20573<sup>T</sup>, DSM20575<sup>T</sup>, DSM17475<sup>T</sup>, DSM25819<sup>T</sup> (*S. constellatus* subsp. *viborgensis* (64)) respetivamente. Pista 14 controlo negativo (água purificada). P1 e P15 – Marcador “1 kb plus” (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia).

No quadro 9 indicam-se as identificações hospitalares destas estirpes: 22 (10,3%) foram identificadas pelo grupo de Lancefield, 92 (43,2%) pelo grupo (*S. milleri*) e 99 (46,5%) pela espécie. No entanto estas classificações não corresponderam na sua maioria às identificações obtidas por PCR. Das 213 estirpes, apenas 50 (23,5%) tinham uma correta identificação ao nível da espécie sendo destas, nove do total de estirpes de *S. anginosus* subsp. *anginosus* (7,6%), três de *S. intermedius* (42,9%) e 38 de *S. constellatus* subsp. *constellatus* (50,7%). Das subespécies recentemente descritas, *S. anginosus* subsp. *whileyi* e *S. constellatus* subsp. *pharyngis*, nenhuma estirpe estava identificada corretamente ao nível da espécie, contudo 40% e 50% das estirpes de cada subespécie respetivamente, possuíam identificação original de “grupo C ou G de Lancefield”.

**Quadro 9:** Identificação hospitalar das estirpes de cada espécie e subespécie de SAG.

Quadro 3: Identificação hospitalar das cepas de cada espécie e subespécie de SIRS.								
	Grupo C ou G <sup>1</sup>	Grupo F <sup>1</sup>	<i>S. anginosus</i>	<i>S. constellatus</i>	<i>S. intermedius</i>	<i>S. milleri</i>	Total	
PCR	S.a.a	5	2	9	34	7	61	118
	S.a.w	2	0	0	1	1	1	5
	S.c.c	1	8	3	38	0	25	75
	S.c.ph	4	0	0	0	1	3	8
	S. i	0	0	0	2	3	2	7
Total	12	10	12	75	12	92	213	

<sup>1</sup>Grupo de Lancefield

### 3.2 Caraterização fenotípica das estirpes

#### 3.2.1 Hemólise e grupo de Lancefield

Nas estirpes da coleção invasiva (n=98) foi comparada a reação hemolítica em sangue de carneiro e cavalo, nas quais se concluiu que apenas existiam ligeiras diferenças em estirpes que apresentavam hemólises  $\alpha$  em sangue de carneiro, por vezes difíceis de interpretar, que diferiam da análise em sangue de cavalo, onde eram  $\gamma$ -hemolíticas. Além disso, em sangue de carneiro, estirpes não hemolíticas em colónias isoladas eram frequentemente  $\alpha$ -hemolíticas em zonas de crescimento mais denso. Para colmatar estas dificuldades, no presente estudo, a hemólise foi analisada em colónias isoladas e as estirpes classificadas apenas como “ $\beta$ -hemolíticas” e “não  $\beta$ -hemolíticas” (incluindo a  $\alpha$ -hemólise e a ausência de hemólise), optando-se pelo sangue de carneiro por permitir maior comparação com a literatura. O quadro 10 apresenta a distribuição dos grupos de Lancefield e o tipo de hemólise pelos taxa de SAG que, complementada com o quadro 13, nos permite fazer a análise estatística para estas caraterísticas. Como se pode observar, *S. anginosus* subsp. *anginosus* pode ser, ou não,  $\beta$ -hemolítico embora na

maioria das estirpes não tenha sido encontrada  $\beta$ -hemólise ( $p \leq 0,001$ ). Na presença de  $\beta$ -hemólise apresenta grupo de Lancefield A, F e G, enquanto que na ausência apresenta além destes, grupo C ou ausência de grupo. O facto de a maior parte das estirpes possuírem antigénio de Lancefield (80,5%) faz com que haja associação muito significativa para a sua presença ( $p < 0,001$ ). Apesar de apenas uma minoria das estirpes possuírem o grupo A (10,2%) ou grupo G (13,6%), esta é a única unidade taxonómica do grupo que os apresenta. O grupo F apresenta também associação estatística com *S. anginosus* subsp. *anginosus* (41,5%,  $p = 0,014$ ). Pelo contrário, *S. intermedius* nunca apresentou  $\beta$ -hemólise nem antigénio de Lancefield ( $p = 0,001$ ). Tanto *S. anginosus* subsp. *whileyi* como *S. constellatus* subsp. *pharyngis* apresentaram o antigénio C de Lancefield e são  $\beta$ -hemolíticos sem exceções, estando por isso este antigénio intimamente associado a estes dois *taxa* ( $p \leq 0,001$  para ambos). *S. constellatus* subsp. *constellatus* pode ser  $\beta$ -hemolítico ou não, e apresentar grupo C ou F mas está significativamente associado à ausência de antigénio de Lancefield (62,5% das estirpes sem grupo de Lancefield;  $p < 0,001$ ). Contrastando com os outros *taxa*, na ausência de antigénio de Lancefield foi observada  $\beta$ -hemólise ( $n=4$ ). Embora predominem as estirpes não  $\beta$ -hemolíticas existe uma grande proporção de estirpes  $\beta$ -hemolíticas (34,6%), em comparação com outros *taxa* o que permite uma associação estatística entre a produção de  $\beta$ -hemólise e *S. constellatus* subsp. *constellatus* ( $p = 0,004$ ).

**Quadro 10:** Caraterização da amostra quanto à hemólise e ao grupo de Lancefield.

	A	C	F	G	Sem grupo	Total
<b><i>S. anginosus</i> subsp. <i>anginosus</i></b>	<b>12</b>	<b>18</b>	<b>49</b>	<b>16</b>	<b>23</b>	<b>118</b>
Não $\beta$ -hemólise	11	18	48	8	23	108
$\beta$ -hemólise	1	-	1	8	-	10
<b><i>S. anginosus</i> subsp. <i>whileyi</i></b>	<b>-</b>	<b>5</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>5</b>
$\beta$ -hemólise	-	5	-	-	-	5
<b><i>S. constellatus</i> subsp. <i>constellatus</i></b>	<b>-</b>	<b>1</b>	<b>24</b>	<b>-</b>	<b>50</b>	<b>75</b>
Não $\beta$ -hemólise	-	1	2	-	46	49
$\beta$ -hemólise	-	-	22	-	4	26
<b><i>S. constellatus</i> subsp. <i>pharyngis</i></b>	<b>-</b>	<b>8</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>8</b>
$\beta$ -hemólise	-	8	-	-	-	8
<b><i>S. intermedius</i></b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>7</b>	<b>7</b>
Não $\beta$ -hemólise	-	-	-	-	7	7
<b>Total</b>	<b>12</b>	<b>32</b>	<b>73</b>	<b>16</b>	<b>80</b>	<b>213</b>

Através do quadro 11 foi também testada a associação estatística entre a capacidade hemolítica e a presença de antigénios de Lancefield específicos na membrana. Assim, apesar de apenas uma minoria das estirpes do grupo C e F produzirem  $\beta$ -hemólise

(40,6% e 31,5% respetivamente), estes juntamente com o grupo G, em que 50% das estirpes são  $\beta$ -hemolíticas, são os antigénios de Lancefield que mais estão associados a esta capacidade de hemólise do meio ( $p=0,021$ ,  $p=0,04$  e  $p=0,013$  respetivamente para os grupos C, F e G), associação que se mantém mesmo depois de o ajuste para testes múltiplos. Por outro lado, a ausência de antígeno de Lancefield está fortemente associada à ausência de hemólise ( $p\leq 0,001$ ).

**Quadro 11:** Análise estatística da invasividade, grupo de Lancefield, faixa etária, género e hemólise.

		Invasividade					$\beta$ -Hemólise				
		Invasivo (n)	Não invasivo (n)	OR	Fisher	FDR	$\beta$	Não $\beta$	OR	Fisher	FDR
Lancefield	A	7	5	1,69	0,392	0,490	1	11	0,29	0,304	0,304
	C	15	17	1,04	1,000	1,000	13	19	2,74	0,021 <sup>S</sup>	0,034 <sup>S</sup>
	F	28	45	0,62	0,113	0,189	23	50	2,01	0,040 <sup>S</sup>	0,050 <sup>S</sup>
	G	3	13	0,25	0,034 <sup>S</sup>	0,086	8	8	3,77	0,013 <sup>S</sup>	0,033 <sup>S</sup>
	Nenhum	45	35	1,93	0,023 <sup>S</sup>	0,086	4	76	0,10	<0,001 <sup>S</sup>	<0,001 <sup>S</sup>
	Total	98	115				49	164			
Faixa etária	[0-18]	6	23	0,26	0,004 <sup>S</sup>	0,012 <sup>S</sup>	15	14	4,68	<0,001 <sup>S</sup>	0,001 <sup>S</sup>
	[19-65]	51	64	0,87	0,679	0,679	24	91	0,77	0,514	0,514
	[>65]	41	28	2,23	0,008 <sup>S</sup>	0,012 <sup>S</sup>	10	59	0,46	0,055	0,082
	Total	98	115				49	164			
Género	Feminino	42	50	0,98	1,000	1,000	17	75	0,63	0,191	0,191
	Masculino	56	65	1,03	1,000	1,000	32	89	1,58	0,191	0,191
	Total	98	115				49	164			
Hemólise	$\beta$	14	35	0,38	0,006 <sup>S</sup>	0,006 <sup>S</sup>					
	Não $\beta$	84	80	2,61	0,006 <sup>S</sup>	0,006 <sup>S</sup>					
	Total	98	115								

OR>1 indica associação entre a proveniência das estirpes de infeções invasivas, ou a  $\beta$ -hemólise das colónias, e o parâmetro que corresponde horizontalmente. OR≤1 indica uma associação entre a recolha em infeções não invasivas ou a ausência de  $\beta$ -hemólise das colónias, e o parâmetro em causa. Os valores a azul e o “S” representam os valores estatisticamente significativos pelo teste de Fisher ( $p\leq 0,05$ ) ou pelo teste de correção de falsos positivos ( $FDR\leq 0,05$ ).

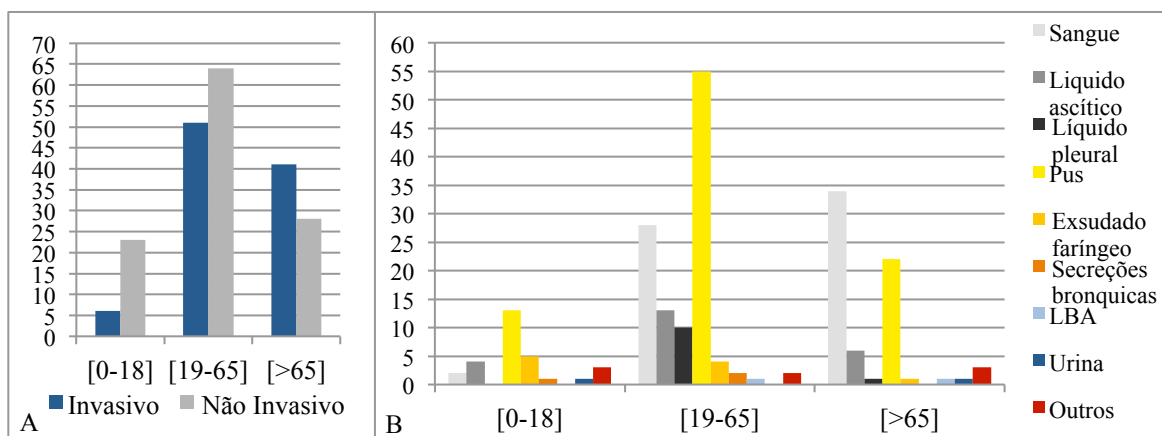
### 3.3 Caraterização da amostra

A amostra é constituída por 92 estirpes isoladas de doentes do sexo feminino, sendo destas 42 provenientes de produtos invasivos. As restantes 121 estirpes foram isoladas de doentes do sexo masculino, sendo 56 de produtos invasivos. A idade média dos doentes é de 49,1 anos sendo mais elevada no caso das amostras invasivas, 56,5 anos, do que no caso das não invasivas, 42,8 anos. Todas as faixas etárias estão contempladas (1 dia a 93 anos) embora numa distribuição não equitativa: 29 amostras eram provenientes de crianças [0-18] anos, 115 de adultos [19-65] anos e 69 de idosos [>65].

#### 3.3.1 Grupos etários

Nos gráficos da figura 6 está representada a distribuição dos produtos pelos grupos etários, encontrando-se a respetiva análise estatística nos quadros 11 e 14. Enquanto nas crianças e adultos predomina a infeção não invasiva, com uma associação significativa

para as crianças ( $p=0,004$ ), na população idosa a tendência inverte-se e a maior parte das amostras provêm de infecção invasiva ( $p=0,008$ ). No caso de produtos recolhidos de infecções invasivas destaca-se o isolamento de SAG a partir do líquido ascítico nas crianças ( $p=0,026$ ), do líquido pleural e sangue em adultos ( $p=0,008$  e  $p=0,034$  respetivamente) e em idosos ( $p=0,023$  e  $p=0,002$  respetivamente). Por outro lado, nas infecções não invasivas a recolha de SAG em amostras de pus predomina em todas as faixas etárias tendo associação estatística nos adultos ( $p=0,039$ ) e crianças ( $p=0,009$ ), perdida quando corrigido para FDR. A recolha de estirpes em exsudado faríngeo está associada à faixa etária mais jovem ( $p=0,026$ ). No quadro 13 encontra-se a distribuição das espécies pelas faixas etárias e respetiva análise estatística. Não se verificou associação entre nenhum *taxon* e uma faixa etária contudo, o grupo etário das crianças está associado à ausência de infecção por *S. anginosus* subsp. *anginosus* ( $p=0,047$ ).



**Figura 6:** A) Representação gráfica da distribuição das amostras como provenientes de infeções invasivas ou não invasivas pelas classes etárias. B) Representação gráfica da distribuição dos produtos biológicos pelas classes etárias.

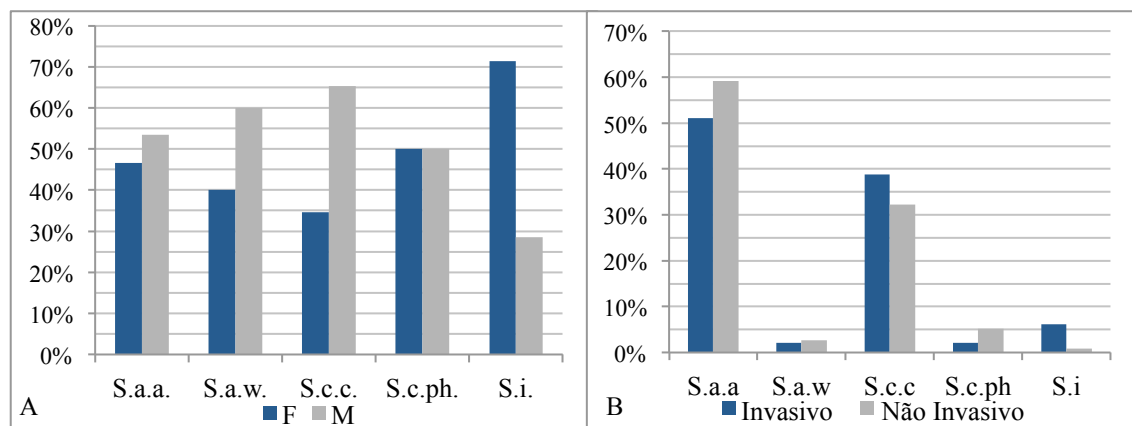
### 3.3.2 Género

Na figura 7A está representada a percentagem de cada *taxon* em função do género e no quadro 14 o número de estirpes com proveniência de cada produto nos dois géneros. Embora haja ligeiras diferenças percentuais no isolamento de estirpes dos diferentes *taxa* e isoladas dos vários produtos, em função do género, não se verificou nenhuma associação apoiada estatisticamente.

### 3.3.3 Invasividade

Na figura 7B apresenta-se a distribuição das estirpes pelos *taxa* do grupo em função de terem sido isolados de produtos habitualmente estéreis ou não. Embora sem diferenças

estatisticamente significativas, observa-se que em ambas as subespécies de *S. anginosus* e em *S. constellatus* subsp. *pharyngis*, a recolha de estirpes foi proporcionalmente superior em infeções não invasivas. Por outro lado, as infeções invasivas apresentaram uma proporção superior de *S. constellatus* subsp. *constellatus* e *S. intermedius* que está associado de forma significativa a infeções invasivas ( $p=0,050$ ), mas perdendo-se a associação quando o valor é corrigido para testes múltiplos.



**Figura 7:** Representação gráfica da percentagem de estirpes dos diversos taxa em função do género (A) e em função da proveniência das amostras de infeção invasiva ou não invasiva (B).

### 3.3.4 Produto

No quadro 12 está representada a distribuição dos produtos de isolamento das estirpes, pelos taxa segundo a identificação por PCR. Foi calculada a associação estatística (quadro 13) quer entre o produto biológico e o total das estirpes, quer entre o produto e as estirpes do tipo de infeção em causa. Verifica-se que *S. anginosus* subsp. *anginosus* é o taxon mais isolado ( $n=118$ ), seguido de *S. constellatus* subsp. *constellatus* ( $n=75$ ) e com menor frequência *S. constellatus* subsp. *pharyngis* ( $n=8$ ), *S. intermedius* ( $n=7$ ) e *S. anginosus* subsp. *whileyi* ( $n=5$ ). Nas estirpes invasivas de *S. anginosus* subsp. *anginosus* observa-se uma predominância das amostras recolhidas do sangue (62,0%), seguido do líquido ascítico (30,0%) e líquido pleural (8,0%), sem significado estatístico. Já nas infeções não invasivas por *S. anginosus* subsp. *anginosus* ( $n=68$ ) a maior parte das estirpes foram recolhidas de pus (85,3%) seguido do exsudado faríngeo (5,9%) e restantes locais de infeção com uma estirpe cada. Apesar de presente em todos os produtos predominou no pus, considerando todos ( $p=0,026$ ) ou apenas os produtos não invasivos ( $p=0,038$ ), associação perdida após a correção para FDR.

Para *S. constellatus* subsp. *constellatus* destaca-se mais uma vez a grande prevalência de estirpes em amostras de sangue (65,8%) e pus (78,4%) nas infeções invasivas e não invasivas respetivamente. Não obstante, o largo espectro de locais de onde é recolhido, representado pelo facto de estar presente em todos os tipos de produtos isolados, faz com que não haja associação estatística com nenhum produto em particular.

*S. anginosus* subsp. *whileyi* foi identificado em amostras de sangue (n=2, 40%), exsudados faríngeos (n=2, 40%) e numa amostra de pus (20%). Encontrou-se associação estatística para a prevalência de *S. anginosus* subsp. *whileyi* em exsudados faríngeos visto que das 10 amostras recolhidas deste local, duas pertenceram a este *taxon* [p=0,018 (no total das estirpes) e p=0,020 (nas amostras não invasivas)] mas a associação é perdida com a correção para FDR.

*S. constellatus* subsp. *pharyngis* predominou mais em infeção não invasiva. Destacam-se as amostras de exsudado faríngeo [n=3, p=0,008 e p=0,02 após FDR] tendo havido uma amostra de cada um dos seguintes locais: sangue, líquido ascítico, pus, secreções brônquicas e outros (exsudado do ouvido). Este é também o *taxon* com menor probabilidade de ser isolado de amostras de pus (p=0,002 no total das amostras não invasivas).

*S. intermedius* foi identificado quase exclusivamente em amostras invasivas, onde foram isoladas cinco estirpes de sangue (71,4%) e uma de líquido pleural. Foi ainda recolhida uma estirpe não invasiva de uma amostra de pus. Tal como seria de esperar pela associação significativa com a forma invasiva da infeção, já descrita, *S. intermedius* está associado a infeções no sangue (p=0,027), associação que se perde quando corrigido para FDR ou quando consideradas apenas amostras invasivas.

**Quadro 12:** Distribuição das estirpes pelos diferentes *taxa* e produtos de isolamento das mesmas.

	Invasivo				Não Invasivo							Total
	Sangue	Líquido Pleural	Líquido Ascítico		Pus	Exsudado faríngeo	Secreções brônquicas	LBA	Urina	Outros		
<i>S. anginosus</i> subsp. <i>anginosus</i>	31	15	4		58	4	1	1	1	3		118
<i>S. anginosus</i> subsp. <i>whileyi</i>	2	0	0		1	2	0	0	0	0		5
<i>S. constellatus</i> subsp. <i>constellatus</i>	25	7	6		29	1	1	1	1	4		75
<i>S. constellatus</i> subsp. <i>pharyngis</i>	1	1	0		1	3	1	0	0	1		8
<i>S. intermedius</i>	5	0	1		1	0	0	0	0	0		7
<b>Total</b>	64	23	11		90	10	3	2	2	8		213
	98				115							



**Quadro 13:** Análise estatística da caracterização da amostra em função do *taxon*.

		<i>S. anginosus</i> subsp. <i>anginosus</i>				<i>S. anginosus</i> subsp. <i>whileyi</i>				<i>S. constellatus</i> subsp. <i>constellatus</i>				<i>S. constellatus</i> subsp. <i>pharyngis</i>				<i>S. intermedius</i>			
		n	OR	Fisher	FDR	n	OR	Fisher	FDR	n	OR	Fisher	FDR	n	OR	Fisher	FDR	n	OR	Fisher	FDR
Invasividade	Invasivo	50	0,72	0,269	0,398	2	0,78	1,000	1,000	38	1,33	0,319	0,398	2	0,38	0,292	0,398	6	7,38	0,050 <sup>S</sup>	0,250
	Não invasivo	68	1,39	0,269	0,398	3	1,28	1,000	1,000	37	0,75	0,319	0,398	6	2,63	0,292	0,398	1	0,14	0,050 <sup>S</sup>	0,250
	Total	118				5				75				8				7			
Produto	Sangue	31	0,67	0,229	0,681	2	1,57	0,638	1,000	25	1,27	0,439	0,846	1	0,32	0,440	0,792	5	6,17	0,027 <sup>S</sup>	0,241
	Líquido Ascítico	15	1,58	0,378	0,681	0	0,00	1,000	1,000	7	0,79	0,818	1,000	1	1,19	1,000	1,000	0	0,00	1,000	1,000
	Líquido Pleural	4	0,44	0,224	0,681	0	0,00	1,000	1,000	6	2,30	0,200	0,846	0	0,00	1,000	1,000	1	3,24	0,314	0,942
	Pus	58	1,90	0,026 <sup>S</sup>	0,234	1	0,34	0,399	1,000	29	0,80	0,470	0,846	1	0,19	0,142	0,427	1	0,22	0,243	0,942
	Exsudado faríngeo	4	0,52	0,347	0,681	2	16,0	0,018 <sup>S</sup>	0,166	1	0,19	0,103	0,846	3	16,3	0,004 <sup>S</sup>	0,034 <sup>S</sup>	0	0,00	1,000	1,000
	Secreções brônquicas	1	0,40	0,587	0,755	0	0,00	1,000	1,000	1	0,92	1,000	1,000	1	13,9	0,109	0,427	0	0,00	1,000	1,000
	LBA	1	0,80	1,000	1,000	0	0,00	1,000	1,000	1	1,85	1,000	1,000	0	0,00	1,000	1,000	0	0,00	1,000	1,000
	Urina	1	0,80	1,000	1,000	0	0,00	1,000	1,000	1	1,85	1,000	1,000	0	0,00	1,000	1,000	0	0,00	1,000	1,000
	Outros	3	0,47	0,471	0,707	0	0,00	1,000	1,000	4	1,88	0,456	0,846	1	3,99	0,268	0,602	0	0,00	1,000	1,000
	Total	118				5				75				8				7			
Produto invasivo	Sangue	31	0,74	0,529	0,529	2	Inf	0,542	1,000	25	1,04	1,000	1,000	1	0,53	1,000	1,000	5	2,77	0,661	0,661
	Líquido Ascítico	15	2,13	0,154	0,463	0	0,00	1,000	1,000	7	0,62	0,464	0,697	1	3,31	0,416	1,000	0	0,00	0,331	0,661
	Líquido Pleural	4	0,51	0,352	0,527	0	0,00	1,000	1,000	6	2,05	0,329	0,697	0	0,00	1,000	1,000	1	1,63	0,520	0,661
	Total	50				2				38				2				6	98,0		
Produto não invasivo	Pus	58	2,69	0,038 <sup>S</sup>	0,229	1	0,13	0,119	0,356	29	1,01	1,000	1,000	1	0,05	0,002 <sup>S</sup>	0,011 <sup>S</sup>	1	Inf	1,000	1,000
	Exsudado faríngeo	4	0,43	0,313	0,625	2	24,2	0,020 <sup>S</sup>	0,118	1	0,22	0,164	0,805	3	13,8	0,008 <sup>S</sup>	0,02 <sup>S</sup>	0	0,00	1,000	1,000
	Secreções brônquicas	1	0,34	0,566	0,850	0	0,00	1,000	1,000	1	1,06	1,000	1,000	1	10,1	0,150	0,299	0	0,00	1,000	1,000
	LBA	1	0,69	1,000	1,000	0	0,00	1,000	1,000	1	2,12	0,542	0,813	0	0,00	1,000	1,000	0	0,00	1,000	1,000
	Urina	1	0,69	1,000	1,000	0	0,00	1,000	1,000	1	2,12	0,542	0,813	0	0,00	1,000	1,000	0	0,00	1,000	1,000
	Outros	3	0,39	0,269	0,625	0	0,00	1,000	1,000	4	2,23	0,268	0,805	1	2,87	0,358	0,537	0	0,00	1,000	1,000
	Total	68				3				37				6				1			
Género	Feminino	55	1,37	0,270	0,449	2	0,87	1,000	1,000	26	0,58	0,082	0,410	4	1,33	0,729	0,911	5	3,40	0,243	0,450
	Masculino	63	0,73	0,270	0,449	3	1,14	1,000	1,000	49	1,72	0,082	0,410	4	0,75	0,729	0,911	2	0,29	0,243	0,450
	Total	118				5				75				8				7			

OR>1 indica uma associação entre o *taxon* e a invasividade, produto de recolha ou género. OR≤1 indica uma associação entre o *taxon* e a ausência do parâmetro em causa (horizontal). Os valores a azul e o “S” representam os valores estatisticamente significativos pelo teste de Fisher (p≤0,05) ou pelo teste de correção de falsos positivos (FDR≤0,05). “Inf”-Infinito.

**Quadro 13:** Análise estatística da caracterização da amostra em função do *taxon* (continuação).

		<i>S. anginosus</i> subsp. <i>anginosus</i>				<i>S. anginosus</i> subsp. <i>whileyi</i>				<i>S. constellatus</i> subsp. <i>constellatus</i>				<i>S. constellatus</i> subsp. <i>pharyngis</i>				<i>S. intermedius</i>			
		n	OR	Fisher	FDR	n	OR	Fisher	FDR	n	OR	Fisher	FDR	n	OR	Fisher	FDR	n	OR	Fisher	FDR
Hemólise	β-hemolítico	10	0,13	<0,001 <sup>s</sup>	<0,001 <sup>s</sup>	5	Inf	0,001 <sup>s</sup>	0,001 <sup>s</sup>	26	2,64	0,004 <sup>s</sup>	0,005 <sup>s</sup>	8	Inf	<0,001 <sup>s</sup>	<0,001 <sup>s</sup>	0	0,00	0,356	0,356
	Não β-hemolítico	108	7,44	<0,001 <sup>s</sup>	<0,001 <sup>s</sup>	0	0,00	0,001 <sup>s</sup>	0,001 <sup>s</sup>	49	0,38	0,004 <sup>s</sup>	0,005 <sup>s</sup>	0	0,00	<0,001 <sup>s</sup>	<0,001 <sup>s</sup>	7	Inf	0,356	0,356
	Total	118				5				75				8				7			
Grupo de Lancefield	A	12	Inf	0,001 <sup>s</sup>	0,001 <sup>s</sup>	0	0,00	1,000	1,000	0	0,00	0,009 <sup>s</sup>	0,012 <sup>s</sup>	0	0,00	1,000	1,000	0	0,00	1,000	1,000
	C	18	1,04	1,000	1,000	5	Inf	<0,001 <sup>s</sup>	<0,001 <sup>s</sup>	1	0,05	<0,001 <sup>s</sup>	<0,001 <sup>s</sup>	8	Inf	<0,001 <sup>s</sup>	<0,001 <sup>s</sup>	0	0,00	0,598	0,996
	F	49	2,09	0,014 <sup>s</sup>	0,017 <sup>s</sup>	0	0,00	0,168	0,279	24	0,86	0,652	0,652	0	0,00	0,053	0,088	0	0,00	0,098	0,246
	G	16	Inf	<0,001 <sup>s</sup>	<0,001 <sup>s</sup>	0	0,00	1,000	1,000	0	0,00	0,001 <sup>s</sup>	0,001 <sup>s</sup>	0	0,00	1,000	1,000	0	0,00	1,000	1,000
	Nenhum	23	0,16	<0,001 <sup>s</sup>	<0,001 <sup>s</sup>	0	0,00	0,159	0,279	50	7,12	<0,001 <sup>s</sup>	<0,001 <sup>s</sup>	0	0,00	0,026 <sup>s</sup>	0,066	7	Inf	0,001 <sup>s</sup>	0,004 <sup>s</sup>
	Total	118				5				75				8				7			
Faixa etária	[0-18]	11	0,44	0,047 <sup>s</sup>	0,199	1	1,60	0,523	0,597	14	1,88	0,143	0,238	3	4,09	0,079	0,199	0	0,00	0,597	0,597
	[19-65]	67	1,28	0,408	0,679	4	3,48	0,377	0,679	36	0,69	0,250	0,679	5	1,44	0,729	0,729	3	0,63	0,706	0,729
	[>65]	40	1,17	0,660	0,825	0	0,00	0,177	0,362	25	1,07	0,879	0,879	0	0,00	0,056	0,280	4	2,88	0,217	0,362
	Total	118				5				75				8				7			

OR>1 indica uma associação entre o *taxon* e o tipo de hemólise, grupo de Lancefield ou faixa etária. OR≤1 indica uma associação entre o *taxon* e a ausência do parâmetro em causa (horizontal). Os valores a azul e o “S” representam os valores estatisticamente significativos pelo teste de Fisher (p≤0,05) ou pelo teste de correção de falsos positivos (FDR≤0,05). “Inf”-Infinito.

**Quadro 14:** Análise estatística da caracterização da amostra em função do grupo etário e sexo.

		Faixa Etária												Gênero					Total
		[0-18]				[19-65]				[>65]									
		n	OR	Fisher	FDR	n	OR	Fisher	FDR	n	OR	Fisher	FDR	Fem	Masc	OR	Fisher	FDR	
Invasivo	Sangue	2	0,246	0,178	0,267	28	0,38	0,034 <sup>s</sup>	0,050	34	4,31	0,002 <sup>s</sup>	0,007 <sup>s</sup>	30	34	1,61	0,29	0,51	64
	Líquido Ascítico	4	7,472	0,026 <sup>s</sup>	0,078	13	1,26	0,643	0,643	6	0,41	0,095	0,095	9	14	0,82	0,81	0,81	23
	Líquido Pleural	0	0,00	1,000	1,000	10	11,01	0,008 <sup>s</sup>	0,025 <sup>s</sup>	1	0,12	0,023 <sup>s</sup>	0,035 <sup>s</sup>	3	8	0,46	0,34	0,51	11
	Total	6				51				41				42	56				98
Não Invasivo	Pus	13	0,26	0,009 <sup>s</sup>	0,056	55	2,77	0,039 <sup>s</sup>	0,236	22	1,02	1,000	1,000	37	53	0,65	0,37	0,55	90
	Exsudado faríngeo	5	4,74	0,026 <sup>s</sup>	0,079	4	0,50	0,335	0,502	1	0,32	0,447	0,670	6	4	2,07	0,33	0,55	10
	Secreções brônquicas	1	2,03	0,491	0,590	2	1,61	1,000	1,000	0	0,00	1,000	1,000	0	3	0,00	0,26	0,55	3
	LBA	0	0,00	1,000	1,000	1	0,80	1,000	1,000	1	3,15	0,429	0,670	1	1	1,30	1,00	1	2
	Urina	1	4,07	0,361	0,542	0	0,00	0,195	0,389	1	3,15	0,429	0,670	1	1	1,30	1,00	1	2
	Outros	3	2,58	0,197	0,394	2	0,24	0,136	0,389	3	1,95	0,401	0,670	5	3	2,28	0,29	0,55	8
	Total	23				64				28				50	65				115

OR>1 indica uma associação entre a faixa etária ou gênero e o produto em causa. OR≤1 indica uma associação entre a faixa etária ou gênero, e a ausência de recolha do produto em causa. Os valores a azul e o “S” representam os valores estatisticamente significativos pelo teste de Fisher (p≤0,05) ou pelo teste de correção de falsos positivos (FDR≤0,05). “Inf”-Infinito.

### 3.4 Identificação não genotípica

#### 3.4.1 Rapid ID 32 STREP

A figura 8 ilustra um exemplo de uma galeria API durante o processo de leitura. No quadro 15 está representada a concordância da identificação das estirpes pelo



**Figura 8:** Exemplo de resultado obtido com o Rapid ID 32 Strep.

sistema Rapid ID 32 Strep, por LM ou LA, com o PCR, e a discordância com o mesmo, que foi classificada em função da gravidade. Deste modo o grau 1 corresponde a uma identificação incorreta ao nível da subespécie apenas (quando aplicável), o grau 2 corresponde à identificação incorreta ao nível da espécie, classificando como outra espécie de SAG, o grau 3 corresponde a uma identificação incorreta ao nível da espécie, classificando como um *Streptococcus* fora de SAG e o grau 4 corresponde à identificação incorreta ao nível do género, espécie e subespécie.

Em primeiro lugar a análise será focada na comparação dos dois métodos de leitura para que se possa prosseguir com um análise mais minuciosa ao nível dos *taxa*. Através do quadro podemos observar que 140 estirpes por LA (65,7%) ou 149 estirpes por LM (70,0%) foram corretamente identificadas tendo em conta, o género, a espécie e a subespécie (se aplicável), enquanto que para 73 estirpes (34,3%), por LA, ou 64 (30,0%), por LM o método não atingiu o resultado esperado. Independentemente do tipo de leitura registaram-se todos os tipos de discordâncias. Contudo, nas discrepâncias da LM em relação à LA, há uma menor gravidade, existindo menos discrepâncias de grau 4, 16 em vez de 23 (25% e 31,5% das discrepâncias respetivamente para LM e LA) e o mesmo se sucede para o grau 3, em que três estirpes por LM, 4,7% dos discordantes e oito estirpes por LA, 10,9%, obtiveram este tipo de discordância. Consequentemente o fenómeno contrário ocorreu nos graus de discordâncias menos graves, grau 1 e grau 2. Ainda assim, estas diferenças na discordância não obtiveram significado estatístico (quadro 16).

Outro ponto que deve ser analisado prende-se com a classificação de qualidade dada pelo *software*. É possível observar que, na LA, das 23 discordâncias de grau 4, 16 delas foram obtidas com uma classificação “A” (69,6%). Por outro lado, apenas três foram obtidas com classificação “E” (13,04%). Já com LM das 16 estirpes discrepantes ao

nível do género (grau 4), 11 tinham classificação “A” na qualidade da identificação (68,75%) e nenhuma tinha classificação “E”. Quando efetuado o teste do qui-quadrado ( $\chi^2$ ) em função das classificações de qualidade, incluídas em cada grau de discrepância e em cada espécie, o “valor de p” foi 0,963, o que indica que apesar de haver diferenças entre os dois métodos de leitura, esta não é significativa. Assim, de agora em diante será considerada apenas a leitura automática para análise da identificação dos *taxa* visto ser o aplicado na rotina clínica de identificação microbiológica.

**Quadro 15:** Concordância das estirpes sujeitas ao sistema de galerias API Rapid ID 32 Strep com o PCR.

	API Leitura automática (LA)						API Leitura manual (LM)					
	Concord antes	Discordantes				Total	Concord antes	Discordantes				Total
		1	2	3	4			1	2	3	4	
<i>S. anginosus</i> subsp. <i>anginosus</i> <sup>1</sup>	81 (68,6%)	0	32	1	4	118	83 (70,3%)	0	32	0	3	118
A	55*	-	7	-	3	65	65*	-	9	-	3	77
B	18	-	22	-	-	40	15	-	20	-	-	35
C	2	-	-	-	-	2	2	-	-	-	-	2
D	3	-	2	1	-	6	1	-	3	-	-	4
E	3	-	1	-	1	5	-	-	-	-	-	-
<i>S. anginosus</i> subsp. <i>whileyi</i> <sup>1</sup>	0 (0%)	2	0	0	3	5	0 (0%)	2	0	0	3	5
A	-	1	-	-	3	4	-	1	-	-	3	4
B	-	1	-	-	-	1	-	1	-	-	-	1
<i>S. constellatus</i> subsp. <i>constellatus</i> <sup>1</sup>	56 (74,7%)	0	2	5	12	75	62 (82,6%)	0	3	2	8	75
A	45	-	1	-	9	55	53	-	1	1	4	59
B	3	-	1	2	-	6	3	-	2	1	-	6
D	7	-	-	1	2	10	6	-	-	-	4	10
E	1	-	-	2	1	4	-	-	-	-	-	-
<i>S. constellatus</i> subsp. <i>pharyngis</i> <sup>1</sup>	0 (0%)	1	4	0	3	8	0 (0%)	2	5	0	1	8
A	-	-	3	-	1	4	-	2	2	-	1	5
B	-	-	1*	-	-	1	-	-	2**	-	-	2
D	-	-	-	-	1	1	-	-	1	-	-	1
E	-	1	-	-	1	2	-	-	-	-	-	-
<i>S. intermedius</i> <sup>1</sup>	3(42,9%)	0	1	2	1	7	4(57,1%)	0	1	1	1	7
A	2**	-	-	-	-	2	3***	-	-	-	-	3
D	1*	-	1*	1*	1	4	1*	-	1*	-	1	3
E	-	-	-	1*	-	1	-	-	-	1*	-	1
Total	140 (65,7%)	3	39	8	23	213	149 (70,0%)	4	41	3	16	213
			73 (34,3%)						64 (30,0%)			

<sup>1</sup> A qualidade das identificações foi classificada pelo sistema API e compilada da seguinte forma:

- Excelente/Muito Boa/ Boa Identificação na espécie/subespécie – A
- Excelente/Muito Boa/ Boa identificação no género - B
- Perfil aceitável - C
- Perfil duvidoso/ Identificação pouco fiável - D
- Perfil inaceitável/ Fraca discriminação (obtida quando existem poucas provas com um resultado positivo, comprometendo a capacidade discriminatória do teste) – E

Uma (\*) duas (\*\*) ou três (\*\*\*) estirpes com nota de rodapé do sistema API: “Possibilidade: *S. constellatus* subsp. *pharyngis*”.

**Quadro 16:** Análise estatística dos métodos de leitura para o Rapid ID 32 Strep - teste de Fisher, simples e ajustado para testes múltiplos (FDR), e teste do qui-quadrado.

Discrepância	API Automático	API Manual	OR	p-value (Fisher)	p-value (FDR)	$\chi^2$
0	141	150	0,82	0,405	0,675	p-value: 0,381
1	1	2	0,50	1,00	1,000	
2	40	42	0,94	0,902	1,000	
3	8	3	2,73	0,220	0,675	
4	23	16	1,49	0,313	0,675	

*S. constellatus* subsp. *constellatus* (n=75) é percentualmente o *taxon* com mais identificações corretas (74,7%), tendo 45 destas elevada qualidade de identificação (80,4%). Este *taxon* apresentou 19 estirpes com identificações discrepantes (25,3%) das quais apenas duas foram identificadas como outra espécie de SAG, mas 12 como pertencentes a outro género (nove das quais com classificação “A”). *S. anginosus* subsp. *anginosus* (n=118) obteve 68,6% identificações corretas<sup>5</sup> (n=81), e destas 55 com uma elevada qualidade de identificação (67,9%). Por outro lado esta subespécie apresentou 37 identificações discordantes do PCR (31,4%), sendo que 32 estirpes foram identificadas como pertencentes a outra espécie do grupo, uma estirpe como pertencente a uma espécie fora do grupo e quatro estirpes como pertencentes a outro género, das quais três com classificação “A”. Um nível inferior de identificações corretas foi obtido para *S. intermedius* (42,9%). Três das sete estirpes obtiveram a classificação de *S. intermedius*, tendo duas destas uma classificação de qualidade “A” e outra “D”. Nas discrepâncias mais uma vez foram observadas de grau 2, 3 e 4 acompanhadas de qualidades fracas de classificação (D e E). *S. anginosus* subsp. *whileyi* (n=5) não obteve nenhuma classificação correta, o que teria de acontecer visto que a base de dados utilizada para comparação ainda não contempla esta subespécie. Assim, duas estirpes (40%) foram identificadas como *S. anginosus* o que corresponde à identificação correta ao nível da espécie. As restantes três estirpes (60%) obtiveram classificações que não correspondiam ao género *Streptococcus*.

Do mesmo modo *S. constellatus* subsp. *pharyngis* não obteve nenhuma identificação correta. No caso deste *taxon*, a versão da base de dados utilizada inclui esta subespécie mas refere que são necessários testes complementares. Das oito estirpes de *S. constellatus* subsp. *pharyngis* apenas uma foi corretamente identificada ao nível da espécie (discrepância de grau 1) embora com uma qualidade de identificação “E”,

<sup>5</sup> Foram consideradas identificações corretas para *S. anginosus* subsp. *anginosus* com apenas a designação *S. anginosus*. Isto aconteceu visto que versão da base de dados utilizada apenas continha a informação da existência da espécie *S. anginosus* e dado que as estirpes anteriormente classificadas como *S. anginosus* passaram a *S. anginosus* subsp. *anginosus* (64).

quatro foram identificadas como *S. intermedius* ou *S. anginosus* (50%, discordância de grau 2) mas com boa qualidade, “A” e “B”, tendo sido as restantes três identificadas como espécies fora do género *Streptococcus* (37,5%). Apesar de nenhuma estirpe ter obtido classificação direta para *S. constellatus* subsp. *pharyngis*, oito estirpes apresentavam a nota “Possibilidade de *S. constellatus* subsp. *pharyngis*” na sua classificação (assinaladas no quadro 15 com o asterisco azul). Destas uma correspondia a uma estirpe de *S. anginosus* subsp. *anginosus* corretamente identificada pelo Rapid ID 32 Strep e com uma qualidade de identificação “A”, seis correspondiam a estirpes de *S. intermedius*, das quais três estavam corretamente identificadas como *S. intermedius* e três eram discordantes. Apenas uma correspondia a uma estirpe de *S. constellatus* subsp. *pharyngis*, embora tivesse sido identificada por este método como pertencendo a outra espécie do grupo. Por fim, das 23 classificações discordantes de grau 4, 82,6% foram identificados como *Lactococcus lactis cremoris*, 8,7% como *Erysipelothrix rhusiopathiae* e 8,7% como espécies do género *Gemella*.

**Quadro 17:** Reações enzimáticas nas galerias de Rapid ID 32 Strep por LA.

	ADH	$\beta$ -GLU	$\beta$ -GAR	$\beta$ -GUR	$\alpha$ -GAL	PAL	RIB	MAN	SOR	LAC	TRE	RAF	VP	APPA	$\beta$ -GAL	PyrA
S.a.a	+	++	---	--	--	++	---	--	---	-	+	--	++	++	--	--
S.a.w	v	v	---	+++	---	+++	---	---	---	-	-	---	+++	+++	---	---
S.c.c	v	--	--	--	--	++	---	--	---	-	v	---	+	+++	--	---
S.c.ph	v	v	v	---	---	+++	---	---	---	v	v	---	+++	+++	---	---
S.i	-	v	+++	---	---	+++	---	---	---	v	v	---	+	+++	v	--

	$\beta$ -NAG	GTA	HIP	GLYC	PUL	MALMEL	MLZ	SAC	LARA	DARL	M $\beta$ DG	TAG	$\beta$ -MAN	CDEX	URE
S.a.a	---	--	---	---	v	++	---	++	---	---	v	--	-	--	--
S.a.w	---	---	---	---	v	v	---	v	---	---	---	---	---	---	---
S.c.c	---	--	---	---	--	v	---	v	---	---	-	--	--	---	---
S.c.ph	--	---	---	---	v	v	---	v	---	---	v	---	---	---	---
S.i	v	-	---	---	v	v	---	v	---	---	---	---	-	---	---

“+++” 100% das estirpes são positivas; “++”  $\geq 90\%$  das estirpes são positivas; “+” 80-90% das estirpes são positivas; “v” variável 20-80% das estirpes são positivas; “-” 10-20% das estirpes são positivas; “--”  $\leq 10\%$  das estirpes são positivas; “---” 100% das estirpes são negativas.<sup>1</sup>

No quadro 17 é possível observar a reação enzimática com substratos presentes na galeria de Rapid ID 32 Strep, em função dos *taxa* do grupo. Para as enzimas ou reações PAL, VP e APPA existem perto de 100% das estirpes do grupo positivas, enquanto  $\alpha$ -GAL, RIB, MAN, SOR, RAF, PyrA, GTA, HIP, GLYC, MEL, MLZ, LARA, DARL, TAG, CDEX e URE apresentam  $\leq 20\%$  de estirpes positivas, ou 100% de estirpes negativas em todos os *taxa*. Assim, estas enzimas não apresentam um bom potencial discriminatório entre *taxa* do grupo, embora em casos particulares possam ser úteis para a diferenciação do grupo dos restantes *Streptococcus*.  $\beta$ -GUR é 100% positivo para

todos os *S. anginosus* subsp. *whileyi* ao contrário dos outros *taxa* com apenas uma a duas estirpes positivas. Um resultado positivo para  $\beta$ -GLU ou PUL diminui a hipótese de se tratar de *S. constellatus* subsp. *constellatus* pois menos de 10% das estirpes são positivas. Um resultado negativo para  $\beta$ -GLU, MAL e SAC diminui a probabilidade de se tratar de *S. anginosus* subsp. *anginosus* ( $\geq 90\%$  positivas). TRE poderá ser útil na distinção entre as subespécies de *S. anginosus* visto que pelo menos 80% das estirpes da subsp. *anginosus* acidificam este substrato e menos de 20% de subsp. *whileyi* o fazem. Algumas estirpes de *S. intermedius* degradam  $\beta$ -GAL,  $\beta$ -NAG e raramente GTA mas nenhum dos outros *taxa* o faz, tornando um resultado positivo, indicativo desta espécie. Através desta análise a identificação das subespécies de *S. constellatus* revela-se a mais difícil, dado que apresentam poucos testes, com pelo menos 80% de estirpes positivas, e quando o fazem são testes para os quais todo o grupo foi maioritariamente positivo ( $\geq 80\%$  para PAL, VP e APPA).

### 3.4.2 MALDI-TOF MS

**Quadro 18:** Exemplo de identificação por MALDI-TOF para uma estirpe de *S. anginosus* subsp. *anginosus*.

Ordem	Estirpe com padrão correspondente	Pontuação	Identificador
1 (++)	<i>Streptococcus anginosus</i> DSM 20563T DSM	2.188	1328
2 (++)	<i>Streptococcus anginosus</i> 0807M10067501 IBS	2.129	1328
3 (+)	<i>Streptococcus constellatus</i> subsp. <i>pharyngis</i> DSM	1.905	184250
4 (+)	<i>Streptococcus intermedius</i> DSM 20573T DSM	1.754	1338
5 (+)	<i>Streptococcus constellatus</i> subsp. <i>constellatus</i> DSM	1.737	184246
6 (-)	<i>Streptococcus sinensis</i> DSM 14990T DSM	1.449	176090
7 (-)	<i>Streptococcus henryi</i> DSM 19005T LGL	1.446	439219
8 (-)	<i>Lactobacillus graminis</i> DSM 20719T DSM	1.404	60519
9 (-)	<i>Jonesia denitrificans</i> DSM 20603T DSM	1.348	43674
10 (-)	<i>Streptococcus sanguinis</i> DSM 20068 DSM	1.346	1305

Para cada estirpe o *software* indica as 10 estirpes com o espectro mais próximo e as respetivas pontuações, tal como o exemplo do quadro 18. Destas selecionou-se apenas a classificação mais elevada para cada estirpe a testar, inferindo assim o seu *taxon*.

No quadro 19 está representada a concordância das estirpes sujeitas a MALDI-TOF com o PCR (coluna da esquerda). Aqui podemos observar que apenas 120 estirpes (56,3%) foram concordantes com o PCR e por isso, corretamente identificadas, enquanto 93 (43,7%) foram discrepantes. No entanto observa-se também que 80 destas estirpes discrepantes (86,0%) tiveram uma discrepância de grau 1, ou seja, foram mal classificadas ao nível da subespécie apenas. Esta discrepância de grau 1 ocorreu na



totalidade dos *S. constellatus* subsp. *constellatus* (n=75) que foram classificados como *S. constellatus* subsp. *pharyngis* com pontuações acima de 1,700 e na totalidade também das estirpes de *S. anginosus* subsp. *whileyi* (n=5). Ainda assim, é preciso destacar que esta última subespécie [descrita em 2013 (64)], não está ainda representada na base de dados utilizada. Deste modo as estirpes de *S. anginosus* subsp. *whileyi* foram classificadas com o *taxon* mais próximo existente na base de dados, *S. anginosus* subsp. *anginosus*, estando esta classificação ainda assim correta ao nível da espécie.

**Quadro 19:** Concordância das estirpes sujeitas ao MALDI-TOF com o PCR<sup>6</sup>.

	Concordantes	Discordantes (grau de discordância)				Total
		1	2	3	4	
<b><i>S. anginosus</i> subsp. <i>anginosus</i><sup>a)</sup></b>	<b>108 (91,5%)</b>	<b>-</b>	<b>7</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>118</b>
[0,000 - 1,699]	3	-	-	-	1	4
[1,700 - 1,999]	17	-	5	-	1	23
[2,000 - 2,299]	82	-	2	-	-	84
[2,300 - 3,000]	6	-	-	1	-	7
<b><i>S. anginosus</i> subsp. <i>whileyi</i><sup>a)</sup></b>	<b>0 (0%)</b>	<b>5</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>5</b>
[0,000 - 1,699]	-	1	-	-	-	1
[1,700 - 1,999]	-	2	-	-	-	2
[2,000 - 2,299]	-	2	-	-	-	2
<b><i>S. constellatus</i> subsp. <i>constellatus</i><sup>a)</sup></b>	<b>0 (0%)</b>	<b>75</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>75</b>
[0,000 - 1,699]	-	1	-	-	-	1
[1,700 - 1,999]	-	26	-	-	-	26
[2,000 - 2,299]	-	38	-	-	-	38
[2,300 - 3,000]	-	10	-	-	-	10
<b><i>S. constellatus</i> subsp. <i>pharyngis</i><sup>a)</sup></b>	<b>8 (100%)</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>8</b>
[1,700 - 1,999]	2	-	-	-	-	2
[2,000 - 2,299]	5	-	-	-	-	5
[2,300 - 3,000]	1	-	-	-	-	1
<b><i>S. intermedius</i><sup>a)</sup></b>	<b>4 (57,1%)</b>	<b>-</b>	<b>2</b>	<b>-</b>	<b>1</b>	<b>7</b>
[0,000 - 1,699]	-	-	-	-	1	1
[1,700 - 1,999]	4	-	2	-	-	6
<b>Total</b>	<b>120 (56,3%)</b>	<b>80</b>	<b>9</b>	<b>1</b>	<b>3</b>	<b>213</b>
		<b>93 (43,7%)</b>				

<sup>a)</sup> A pontuação apresentada foi obtida pelo sistema MALDI-TOF e fornece informação sobre a validade da identificação.

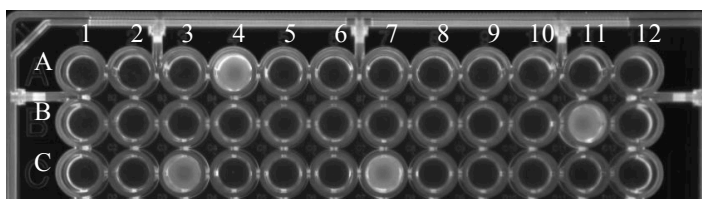
Nove estirpes (9,67% das estirpes discrepantes) obtiveram identificações com discrepâncias de grau 2, ou seja, foram classificadas como sendo outra espécie de SAG, das quais duas estirpes tiveram classificação acima de 2,000, que segundo o sistema representa uma “identificação segura do gene e provável da espécie”. Existiu apenas

<sup>6</sup> A identificação “*S. anginosus*” pelo sistema MALDI-TOF foi considerada correta ao nível da subespécie para *S. anginosus* subsp. *anginosus* visto ser baseada na comparação correta com a estirpe de referência DSM 20563<sup>T</sup> de *S. anginosus* subsp. *anginosus* que anteriormente era apenas referida como *S. anginosus*.



uma discrepância de grau 3, numa estirpe que foi aqui classificada como *S. pyogenes*. Isto representa, um erro grave visto que a identificação foi pontuada com elevada certeza (2,300-3,000). Por fim, apenas três identificações falharam no género, duas das quais consideradas “identificações não fiáveis” e uma “identificação provável no género”, confirmando o baixo grau de certeza que o próprio sistema associava a estas identificações. É possível observar ainda no quadro 19 que o *taxon* melhor identificado por MALDI-TOF é *S. constellatus* subsp. *pharyngis*, no qual 100% (n=8) das estirpes testadas foram corretamente identificadas, seguido de *S. anginosus* subsp. *anginosus* com 91,5% (n=108) das estirpes corretamente identificadas, *S. intermedius* com apenas 57,1% (n=4) e por fim *S. constellatus* subsp. *constellatus* e *S. anginosus* subsp. *whileyi* com 100% de identificações incorretas, já exploradas anteriormente.

### 3.4.3 Identificação e atividade enzimática



**Figura 9:** Exemplo de resultado obtido para o substrato  $\alpha$ -ANA. A1 a C12 inoculados com 20  $\mu$ L do substrato  $\alpha$ -ANA a 100  $\mu$ g/ml. Poços A1 a C5 inoculados com 50  $\mu$ L da suspensão bacteriana, 1 McFarland (em TES) das estirpes a testar. Os poços C6 a C11 foram inoculados com as estirpes de referência pela seguinte ordem: DSM20563<sup>T</sup>, DSM20573<sup>T</sup>, DSM20575<sup>T</sup>, DSM17475<sup>T</sup>, DSM25818<sup>T</sup>, DSM25819<sup>T</sup>. O poço C12 foi inoculado com 50  $\mu$ L de TES. Ocorreu degradação nos poços A4, B11, C3 e C7. Tal como esperado, das estirpes de referência apenas a de *S. intermedius* (DSM20573) apresentou degradação do substrato (C7).

Para uma melhor observação da possível degradação dos substratos foi testada a incubação durante 1 hora e 30 minutos, 3 horas, 4 horas e 30 minutos, 24 horas e 48 horas. Observou-se que, ao fim do primeiro tempo testado as reações existentes eram ainda fracas, mas ao fim de 3 horas havia uma visualização mais clara que também era conseguida às 4 horas. No entanto, quando incubado durante 24 ou 48 horas havia já reações inespecíficas não observadas ao fim de 3 horas, classificadas como tal por incluírem as estirpes de referência, utilizadas como controlos. Assim, o procedimento para todos os substratos foi efetuado com 3 horas de incubação, período ao fim do qual foram obtidas imagens como a apresentada na figura 9.

De acordo com o artigo de revisão de Facklam *et al.* (2002) (33), o quadro 2 representa a diferenciação a efetuar com os substratos selecionados. O quadro 20 mostra a identificação obtida em função da identificação pelo PCR. Na coluna mais à direita

apresenta-se a percentagem de estirpes corretamente identificadas. Para o cálculo desta percentagem, no caso de *S. anginosus*, a identificação foi calculada apenas ao nível da espécie, visto que não era conhecido o perfil fenotípico completo da subespécie *whileyi* e, das enzimas presentes, apenas degradava  $\beta$ -GLU (tal como a subespécie *anginosus*). Assim, observa-se que se por um lado a identificação de *S. anginosus* e *S. intermedius* apresentou resultados ao nível de 100% ou muito próximo, por outro a espécie *S. constellatus* obteve percentagens de identificações corretas muito inferiores. A subespécie *constellatus* obteve 73,3% de estirpes corretamente identificadas e no caso da subespécie *pharyngis* apenas em 12,5% das estirpes (n=1) a identificação correspondeu à identificação por PCR.

**Quadro 20:** Identificação obtida pelo método enzimático (colunas) em função PCR (linhas).

	Não identificados	S.a.	S.c.c.	S.c.ph.	S.i.	Total	% ID correta
<i>S. anginosus</i> subsp. <i>anginosus</i>	-	116	2	-	-	118	98,31%
<i>S. anginosus</i> subsp. <i>whileyi</i>	-	5	-	-	-	5	100%
<i>S. constellatus</i> subsp. <i>constellatus</i>	8	12	55	-	-	75	73,33%
<i>S. constellatus</i> subsp. <i>pharyngis</i>	4	3	-	1	-	8	12,5%
<i>S. intermedius</i>	-	-	-	-	7	7	100%
	<b>12</b>	<b>136</b>	<b>57</b>	<b>1</b>	<b>7</b>	<b>213</b>	<b>86,38%</b>

“% ID correta” - percentagem de identificação correta em cada *taxon*; “S.a.”- *S. anginosus*; “S.c.c.” - *S. constellatus* subsp. *constellatus*; S.c.ph. - *S. constellatus* subsp. *pharyngis*; S.i. - *S. intermedius*.

**Quadro 21:** Percentagem de degradação de cada substrato em função do *taxon*.

	<i>S. anginosus</i>		<i>S. constellatus</i>		<i>S. intermedius</i>	Total
	subsp. <i>anginosus</i>	subsp. <i>whileyi</i>	subsp. <i>constellatus</i>	subsp. <i>pharyngis</i>		
$\alpha$ -GLU	9,3% (v)	0,0%	88,0% (+)	100% (+)	100% (+)	43,2%
$\beta$ -GLU	98,3% (+)	100%	16,0% (-)	75,0% (+)	57,1% (v)	67,1%
$\beta$ -NAGA	0,0% (-)	0,0%	0,0% (-)	25,0% (+)	100% (+)	4,2%
$\beta$ -FUC	0,0% (-)	0,0%	0,0% (-)	62,5% (+)	100% (+)	5,6%
$\alpha$ -ANA	0,0% (-)	0,0%	0,0% (-)	0,0% (-)	100% (+)	3,3%
Total	118	4	75	8	7	

Em percentagem os resultados do presente estudo. Dentro dos parênteses encontra-se os resultados apresentados em 2002 no artigo de revisão de Facklam *et al.* (+) reações positivas em  $\geq 92\%$  das estirpes; (-) reações positivas em  $\leq 8\%$  das estirpes; (v) reação positiva em 9 a 91% das estirpes.  $\beta$ -NAGA: 2'-4 metil-umbeliferil(4MU)-*N*-acetil- $\beta$ -D-galactosaminidase;  $\beta$ -FUC: 4-MU- $\beta$ -D-fucosídeo;  $\alpha$ -GLU: 4-MU- $\alpha$ -D-glicosídeo;  $\beta$ -GLU: 4-MU- $\beta$ -D-glicosídeo e  $\alpha$ -ANA: ácido 4-MU- $\alpha$ -D-*N*-acetil-neuramínico;

O quadro 21 apresenta a percentagem de estirpes de cada *taxon* que degradaram cada um dos substratos testados, permitindo analisar e justificar os resultados apresentados anteriormente. Segundo estudos anteriores (33, 75), uma identificação por este método para *S. anginosus*, é obtida se a estirpe degradar  $\beta$ -GLU e não degradar  $\beta$ -NAGA,  $\beta$ -FUC e  $\alpha$ -ANA, sendo indiferente a reação com o  $\alpha$ -GLU. Assim, o facto de duas

estirpes (1,7%) de *S. anginosus* terem sido identificadas como *S. constellatus* subsp. *constellatus* prende-se com a ausência de degradação de  $\beta$ -GLU, estando nestes casos presente a reação com  $\alpha$ -GLU. No caso de *S. constellatus* subsp. *constellatus*, uma correta identificação é obtida quando a estirpe degrada unicamente  $\alpha$ -GLU, no entanto, pelo quadro 21 verifica-se que apenas 88% das estirpes o fizeram. Contudo, 16% das estirpes degradaram  $\beta$ -GLU, o que levou a uma identificação incorreta como *S. anginosus*, e oito estirpes (10,7%) não mostraram presença de nenhuma das enzimas aqui testadas. A identificação de *S. constellatus* subsp. *pharyngis* era obtida com um resultado negativo para a degradação de  $\alpha$ -ANA mas positivo para as restantes enzimas. No entanto verificou-se que nem todas as estirpes degradaram  $\beta$ -GLU (75%) e  $\beta$ -FUC (62,5%) como esperado e apenas duas estirpes (25%) degradaram  $\beta$ -NAGA. Como consequência três estirpes foram identificadas como *S. anginosus* por degradarem  $\alpha$ -GLU e  $\beta$ -GLU mas nenhum dos restantes substratos, e quatro estirpes não obtiveram identificação, devido à falta de reação com  $\beta$ -NAGA (n=2),  $\beta$ -GLU (n=1) ou  $\beta$ -NAGA e  $\beta$ -GLU (n=1). *S. intermedius* demonstrou ser o *taxon* com maior capacidade degradativa visto que as estirpes desta espécie possuem as enzimas capazes de degradar todos os substratos testados, com exceção de  $\beta$ -GLU cuja capacidade é variável entre as estirpes. Os resultados para cada enzima nas estirpes de *S. intermedius* corresponderam exatamente com os perfis esperados (quadro 2 e 21), assim, todas as estirpes desta espécie obtiveram a identificação correta pelo método enzimático. Numa análise global, quando considerados todos os *taxa* deste grupo, 86,4% das estirpes foram corretamente identificadas. A ausência de degradação de alguns substratos essenciais para uma correta identificação foi o fator mais importante nas falhas na identificação. Por outro lado, a degradação de substratos não esperados apenas afetou a identificação de *S. constellatus* subsp. *constellatus* dado que algumas estirpes degradaram  $\beta$ -GLU.

### 3.4.4 Comparação dos métodos não genotípicos

**Quadro 22:** Quadro-resumo da percentagem de identificações corretas em relação ao PCR nos métodos fenotípicos aplicados.

	Rapid ID 32 Strep	MALDI-TOF	Enzimático <sup>a)</sup>
<i>S. anginosus</i> subsp. <i>anginosus</i>	68,6%	91,5%	98,31%
<i>S. anginosus</i> subsp. <i>whileyi</i>	0%	0%	100%
<i>S. constellatus</i> subsp. <i>constellatus</i>	74,6%	0%	73,33%
<i>S. constellatus</i> subsp. <i>pharyngis</i>	0%	100%	12,5%
<i>S. intermedius</i>	42,9%	57,1%	100%
Total	65,7%	56,3%	86,38%

a) Pelas provas aplicadas para obtenção do perfil enzimático, não é ainda possível distinguir as subespécies de *S. anginosus*. Assim, a percentagem de identificação aqui considerada como correta foi calculada com base no perfil fenotípico da espécie como um todo.

No quadro 22 observa-se a proporção de estirpes corretamente identificadas, em relação ao nosso “gold standard”, o PCR, nos diferentes métodos utilizados. Assim, é possível observar que de forma geral o método enzimático obteve uma percentagem de identificações superior, encontrando-se o MALDI-TOF no extremo oposto, apesar desta análise esconder a complexidade deste problema.

*S. anginosus* subsp. *anginosus* é melhor identificado pelo método enzimático, embora só se possa considerar o nível da espécie (98,3%). Já ao nível da subespécie, MALDI-TOF identifica 91,5% das estirpes deste *taxon*, enquanto Rapid ID 32 Strep identifica 68,6%. *S. anginosus* subsp. *whileyi* não pode ser avaliado dado que os métodos não estão preparados para a sua identificação. *S. constellatus* subsp. *constellatus* foi melhor identificado por Rapid ID 32 Strep dado que o MALDI-TOF, apesar de ter as estirpes de referência das duas subespécies de *S. constellatus*, não consegue fazer esta diferenciação, classificando corretamente *S. constellatus* subsp. *pharyngis* ao nível da subespécie mas atribuindo a mesma classificação a todos os *S. constellatus* subsp. *constellatus* testados. Observou-se aqui um erro sistemático e coerente para todas as estirpes, existindo provavelmente um problema na comparação dos espectros de *S. constellatus* subsp. *constellatus* com o da base de dados. Não sendo possível diferenciar as subespécies de *S. constellatus* por este método, as estirpes de *S. constellatus* subsp. *constellatus* são as principais responsáveis pela baixa percentagem de identificação total deste método (n=75; 35,2% da amostra total). *S. constellatus* subsp. *pharyngis* (n=8) não foi identificado por API e apenas uma das estirpes apontou a possibilidade de pertencer a essa subespécie. Por fim, *S. intermedius* é muito bem identificado pelo método enzimático (100%) mas os dois outros métodos situaram-se em torno dos 50%.

No entanto, esta análise leva-nos a conclusões demasiado simplistas e possivelmente erróneas quanto à eficácia dos métodos. O método enzimático apenas distingue dentro de SAG, o que impede que haja discrepâncias ao nível do género. Por outro lado, os outros dois métodos distinguem, não só entre SAG, como entre todos os *Streptococcus* (Rapid ID 32 Strep) ou entre todo o espectro de bactérias (MALDI-TOF). Assim, não é possível comparar as discrepâncias do método enzimático com as dos outros métodos.

Quando comparados os níveis de concordância e discrepâncias em relação ao PCR, entre os métodos Rapid ID 32 Strep e MALDI-TOF, observa-se que os métodos de identificação possuem resultados diferentes com significado estatístico pelo teste do

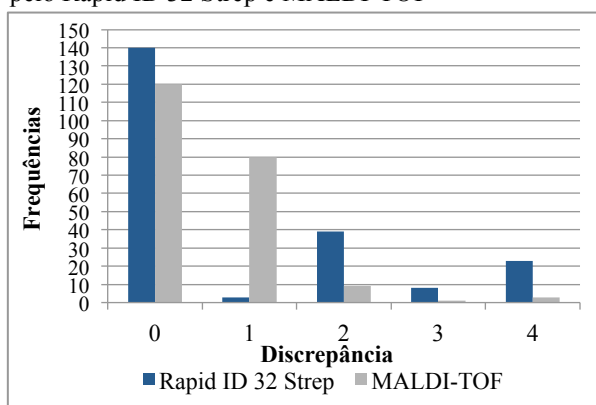
qui-quadrado ( $p \leq 0,001$ ). O teste de Fisher demonstra resultados significativamente diferentes para todos os níveis de discrepâncias mas não para o nível de concordância. Por fim, pela observação do gráfico da figura 10 é possível observar que apesar de ter sido referido anteriormente que o MALDI-TOF tem uma taxa de identificação inferior, como se vê pelo menor número de concordantes (discrepância 0), este é também o que apresenta um maior número de discrepâncias de grau 1, ou seja, discrepante ao nível da subespécie apenas, apresentado depois 9 estirpes discrepantes de grau 2, ao nível da espécie mas ainda com um espectro correspondente a uma espécie de SAG e três estirpes discordantes no género. Uma análise totalmente oposta é feita quando se tem em conta o Rapid ID 32 Strep. Este método, apesar de ter identificado corretamente mais estirpes, foram raros os erros ao nível da subespécie ( $n=3$ ) e substanciais ao nível da espécie dentro de SAG ( $n=39$ ), fora de SAG ( $n=8$ ), e ao nível do género ( $n=23$ ).

Foi ainda realizado o teste da estatística de Kappa para que, simultaneamente à análise da proporção de identificações corretas, fosse feito o ajustamento que permite retirar o fator de aleatoriedade subjacente a todos os testes (quadro 23). No entanto, concluiu-se que esta análise só podia ser realizada em relação à identificação total e não à gravidade das discrepâncias, visto que a estatística só consegue analisar a semelhança ou não semelhança entre os dois métodos, mas não consegue discriminar dentro dos incorretos, os diferentes graus de discrepância. Assim, com a estatística de Kappa, embora se encontrem valores mais baixos de correlação do que os cálculos das percentagens de identificação (quadro 23), a relação entre os métodos mantém-se, sendo o método enzimático o que obtém a melhor correlação com o PCR (0,758), seguida do Rapid ID 32 Strep (0,446) e do MALDI-TOF (0,365). Entre dois métodos que não o PCR as correlações foram mais baixas, à exceção da correlação entre o Rapid ID 32 Strep e o método enzimático (0,394).

**Quadro 23:** Estatística de Kappa da identificação final dos três métodos.

	Estatística Kappa		
	PCR	MALDI-TOF	Rapid ID 32 Strep
PCR			
MALDI-TOF	0,365		
API auto	0,446	0,175	
Enzimas	0,758	0,299	0,394

**Figura 10:** Comparação das discrepâncias obtidas pelo Rapid ID 32 Strep e MALDI-TOF

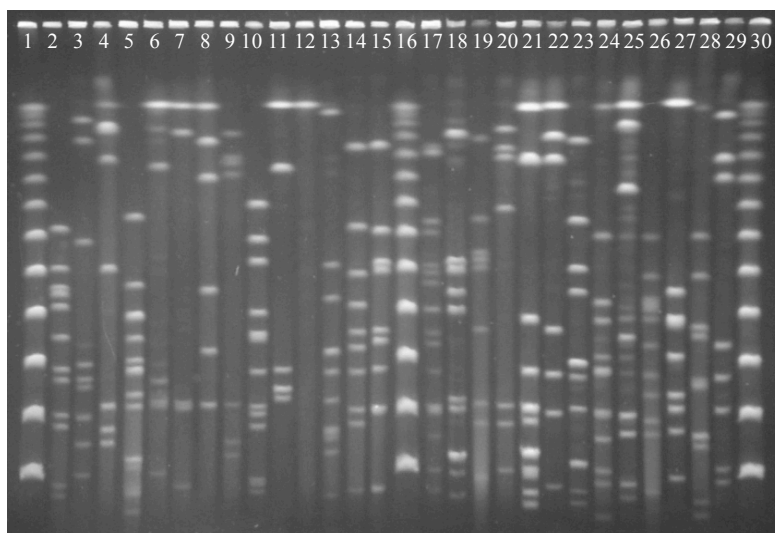


### 3.4.4 Presença dos fatores de virulência: hialuronidase e sulfatase da condroitina

Para este ensaio foram necessárias várias tentativas de otimização tanto do método de inoculação, em gotas ou em risca com ansa, como dos volumes do inóculo e respetiva densidade ótica, parâmetros estes que não eram referidos por nenhum dos autores em que nos baseamos. Concluiu-se que a melhor visualização dos halos ocorria quando o inóculo era feito em gotas de 10µL estando as suspensões bacterianas a uma densidade de 0,5 McFarland. No entanto, apesar destas otimizações, este ensaio não correu como seria de esperar pois quando observada uma zona mais clara em torno de algumas gotas, esta zona era, na maioria das estirpes, bastante ténue levando a interpretações dúbias quanto à presença ou não do halo e por isso do fator de virulência. Quando testadas as estirpes de referência, em cuja presença ou ausência dos fatores de virulência estão já bem definidas, este problema manteve-se não tornando possível distinguir entre as estirpes produtoras ou não de hialuronidase e sulfatase da condroitina. Dado que SAG é um grupo de crescimento lento, a baixa concentração de enzimas de despolimerização presentes ainda às 24h poderiam estar a causar este resultado, por isso tentou-se otimizar o tempo de incubação (24, 48 e 72 horas) antes da revelação. No entanto, à semelhança da variação da concentração do agente revelador (ácido acético), os resultados também não se alteraram. Por esse motivo, não são apresentados na presente dissertação resultados para o teste em placa da presença dos fatores de virulência.

## 3.5. Tipagem Molecular

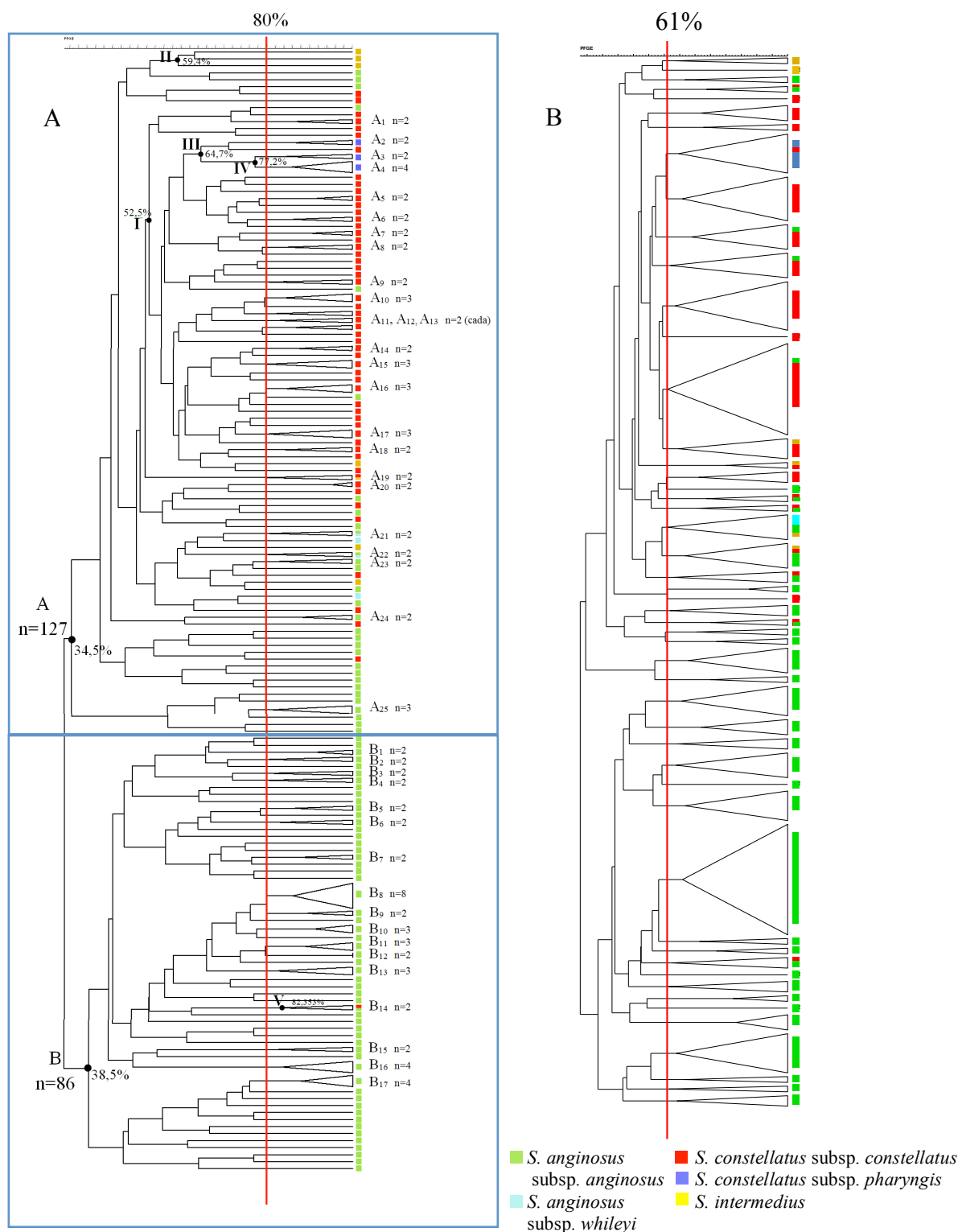
### 3.5.1 PFGE



**Figura 11:** Fotografia de um gel de PFGE, com a enzima SmaI, para 27 estirpes de SAG. As pistas 1, 16 e 30 correspondem ao marcador de tamanho molecular “Lambda Ladder PFGE Marker” (New England BioLabs, Beverly, EUA). As pistas 2-15 e 17-29 correspondem a estirpes da coleção invasiva. A estirpe da pista 12 apresenta apenas uma banda no seu perfil de restrição e a estirpe da pista 25 apresenta digestão incompleta com a enzima SmaI, pelo que foi necessário repetir a técnica de PFGE, para estas estirpes, com a enzima Cfr9I.

Todas as estirpes foram tipáveis através da enzima SmaI, ou pelo seu isosquisómero Cfr9I. A figura 11 mostra um exemplo de um gel de PFGE e a figura 12A o dendrograma obtido pela análise dos perfis de PFGE. Foram observados um total de 151 padrões únicos a partir das 213 estirpes analisadas. Verifica-se em primeiro lugar que as estirpes se dividem em dois grupos *major*, que têm entre eles 32,8% de semelhança, o grupo A com 127 estirpes e o grupo B com 86 estirpes. O grupo A, bastante heterogêneo, é constituído por estirpes dos cinco *taxa* analisados. Ainda assim, a maioria dos clones formados a 80% são constituídos por estirpes do mesmo *taxon*. Exceções são o clone A<sub>19</sub> que agrupa uma estirpe de *S. constellatus* subsp. *constellatus* com uma estirpe de *S. intermedius* e os clones A<sub>21</sub> e A<sub>22</sub> que embora constituídos, cada um, por estirpes de dois *taxa*, pertencem à mesma espécie (*S. anginosus*). Sendo a maioria das estirpes de *S. anginosus* subsp. *anginosus* e *S. constellatus* subsp. *constellatus* também são essas que se destacam neste grupo pela sua dispersão. O grupo I (formado com 52,5% de semelhança) engloba 82,4% das estirpes de *S. constellatus* subsp. *constellatus*, contudo inclui também estirpes das outras duas espécies. *S. intermedius* apesar de possuir apenas sete estirpes, demonstra também extensa heterogeneidade. O grupo II, constituído apenas por este *taxon*, agrupa com 59,4% de semelhança, mas as restantes quatro estirpes encontram-se em zonas distintas do diagrama. *S. constellatus* subsp. *pharyngis* parece ser o *taxon* mais homogêneo dado que, das oito estirpes, quatro formam o clone A<sub>4</sub>, duas formam o clone A<sub>3</sub> e duas formam o clone A<sub>2</sub>. O clone A<sub>3</sub> e A<sub>4</sub> encontram-se ainda relacionados com 77,2% de semelhança (IV). Já o clone A<sub>2</sub>, mais afastado agrupa com estas estirpes a 64,7% (III), grupo que inclui também uma estirpe de *S. constellatus* subsp. *constellatus*. As estirpes de *S. anginosus* subsp. *whileyi*, mais dispersas, não formam clones entre si.

O grupo B apresenta uma homogeneidade muito superior dado que, das 86 estirpes que o constituem, 85 são de *S. anginosus* subsp. *anginosus* (72,0% das estirpes desta subespécie) e apenas uma é de *S. constellatus* subsp. *constellatus*. Esta estirpe agrupa com uma estirpe de *S. anginosus* subsp. *anginosus* no clone B<sub>14</sub> (82,3%). Por esse motivo foi repetida a reação de PCR, que confirmou a identidade de ambas as estirpes do clone. Dentro deste grupo B, cortes sucessivos a diferentes percentagens apenas levam a ramificações sucessivas com estirpes de *S. anginosus* subsp. *anginosus*. Formaram-se 17 clones, num total de 47 estirpes, tendo o clone maior oito estirpes.



**Figura 12:** Dendrogramas dos perfis obtidos por PFGE das 213 estirpes incluídas neste estudo. A escala associada ao dendrograma representa em percentagem os valores de semelhança entre os perfis, calculados pelo coeficiente de Dice, com as definições de otimização e tolerância de 1,0 e 1,5%, respetivamente, e pelo método de agrupamento hierárquico UPGMA. Cada dendrograma foi feito recorrendo ao programa Bionumerics versão 7.1. (A) Foram definidos clones como grupos de pelo menos duas estirpes que apresentassem perfis de PFGE com, pelo menos, 80% de semelhança, cuja percentagem está indicada pelo traço a vermelho. Os clones foram designados pelas letras maiúsculas A e B consoante pertencessem ao grupo *major* A ou B e numerados dentro de cada grupo *major* através dos números em subscrito. (B) Os grupos de PFGE foram definidos como grupos de pelo menos duas estirpes que apresentassem perfis de PFGE com, pelo menos, 61% de semelhança, cuja percentagem está indicada pelo traço a vermelho.



A figura 12B tem por base o mesmo dendrograma que em A, no entanto simulou-se a formação de clones a várias percentagens de semelhança. Seguidamente em função da comparação com as espécies e subespécies, e recorrendo ao AW estimou-se qual seria o melhor valor de corte a usar para SAG, supondo que os clones deveriam agrupar apenas estirpes do mesmo *taxon*. O valor encontrado foi 61%, tal como se apresenta na figura.

### 3.5.2 MLSA – análise de perfis alélicos por MLST

Na figura 13 apresenta-se o diagrama obtido através do algoritmo de goeBURST para MLST, aplicado com os genes de MLSA. No conjunto das 177 estirpes da coleção invasiva do presente estudo e da coleção publicada por Jensen *et al.* (2013), observaram-se 144 STs únicos. Consequentemente, a ausência de STs comuns entre as espécies, confere elevada diversidade, tal como indicado pelo índice de diversidade de Simpson [SID= 0,996; (IC95 (0,993-0,998))]. O ST pode neste caso ser preditivo do *taxon*, comprovado pelo excelente resultado no teste de AW que indica existir 100% de probabilidade de duas estirpes com o mesmo ST pertencerem à mesma espécie, por PCR, e 93,7% [IC95 (0,892-0,982)] de pertencerem à mesma subespécie (se aplicável). Pela observação do diagrama observa-se numa primeira análise a formação de quatro grupos distintos: *S. intermedius*, *S. anginosus* subsp. *anginosus*, *S. constellatus* (englobando as três subespécies) e *S. anginosus* subsp. *whileyi*. Dentro do grupo de *S. intermedius* verifica-se bastante heterogeneidade, dado que as estirpes mais semelhantes são DLV e, mais de 50% dos STs deste *taxon* são 4LV, 5LV ou 6LV entre si. Ainda assim, também o ST mais próximo fora do *taxon* tem apenas um alelo em comum (6LV). O grupo de *S. anginosus* subsp. *anginosus* é também bastante heterogéneo e diverso com várias estirpes 5LV e 6LV intra-*taxon*, o que leva à formação de vários grupos. Por isso mesmo existe um distanciamento de quatro estirpes desta subespécie: ST92 agrupa com o pequeno núcleo de *S. constellatus* subsp. *pharyngis* de Jensen *et al.* e ST16, ST18 e ST139 agrupam ligados à subespécie *whileyi* da mesma espécie, embora sejam 6LV das estirpes com que agrupam. *S. anginosus* subsp. *whileyi* é pelo contrário o grupo mais homogéneo visto que todas as estirpes são SLV entre si. A espécie *constellatus* apresenta homogeneidade superior à observada para a subespécie *anginosus* de *S. anginosus*, uma vez que há menor número de relações por 4LV ou 5LV. Assim, não é possível delimitar claramente as três subespécies de *S. constellatus*. O grupo de estirpes de *S. constellatus* subsp. *pharyngis* de Jensen *et al.* é SLV entre si, o

que sugere bastante homogeneidade. Contudo o conjunto das estirpes de *S. constellatus subsp. pharyngis* da coleção em estudo e de *S. constellatus subsp. viborgensis* de Jensen *et al.* formam um grupo à parte, DLV ao primeiro, mas também SLV e DLV entre si.

A figura 14 representa a análise por MST dos alelos de cada gene em função do *taxon*. Nos sete genes “housekeeping” é possível observar que nos genes *ppac*, *pyk*, *rpoB* e *sodA* há uma maior separação das espécies do grupo, devido à maior diversidade alélica [SID: *ppac* 0,971 IC95 (0,961-0,980); *pyk* 0,933 IC95 (0,913-0,953), *rpoB* 0,947 IC95 (0,929-0,965) e *sodA* 0,961 IC95 (0,949-0,974)]. Pelo contrário nos genes *map*, *pfl* e *tuf* observa-se maior partilha de alelos entre *taxa*, por isso maior condensação do diagrama e, ainda que elevada, menor diversidade de alelos [SID: *map* 0,871 IC95 (0,832-0,909), *pfl* 0,908 IC95 (0,884-0,933), *tuf* 0,886 IC95 (0,859-0,913)].

Esta diversidade implica que nos genes *ppac*, *pyk*, *rpoB* e *sodA*, a partilha de alelos não seja comum entre espécies ou subespécies, sendo *rpoB* e *sodA* os únicos genes em que não houve partilha do mesmo alelo por duas espécies diferentes, (por AW correlação de 100% entre estirpes com mesmo alelo pertencerem à mesma espécie). Os genes *ppac* e *pyk* por sua vez apresentam correlações de 99,2% [IC95 (0,985-1,00)] e 98,8% [IC95 (0,971-1,000)] respetivamente. No caso de *ppac* este resultado deve-se à partilha de um alelo por duas estirpes de *S. constellatus subsp. constellatus* e uma de *S. anginosus subsp. whileyi*, e no gene *pyk*, ao alelo 22 de *S. anginosus subsp. anginosus* que aglomera também uma estirpe de *S. intermedius*. Ainda assim, o gene *pyk* parece ser o gene em que se observa uma melhor separação entre as espécies com maior distância genética entre cada um dos três grupos de estirpes do que entre os alelos que os compõem. Contudo, as subespécies de *S. constellatus* demonstram partilha de alelos apresentando o alelo 32 estirpes das três subespécies. Esta partilha provoca uma descida da correlação quando a análise inclui as subespécies [65,9%; IC95 (0,509-0,808)], o mesmo acontece, pelo mesmo motivo, no gene *rpoB* com o alelo 26 [55,1%; IC95 (0,418-0,685)]. Pelo contrário o gene *sodA*, que tal como *rpoB* apresenta boa correlação alélica para a espécie, mantém a boa correlação na subespécie [85,6%; IC95 (0,780-0,932)] dado que apenas dois alelos aglomeram estirpes de duas subespécies da mesma espécie, *S. constellatus*, e o mesmo alelo nunca inclui as três subespécies. O gene *ppac* destaca-se na sua associação com as subespécies sendo o gene com a melhor correlação alélica para a identificação final do *taxon* por PCR [AW 94,1%; IC95 (0,912-0,969)].

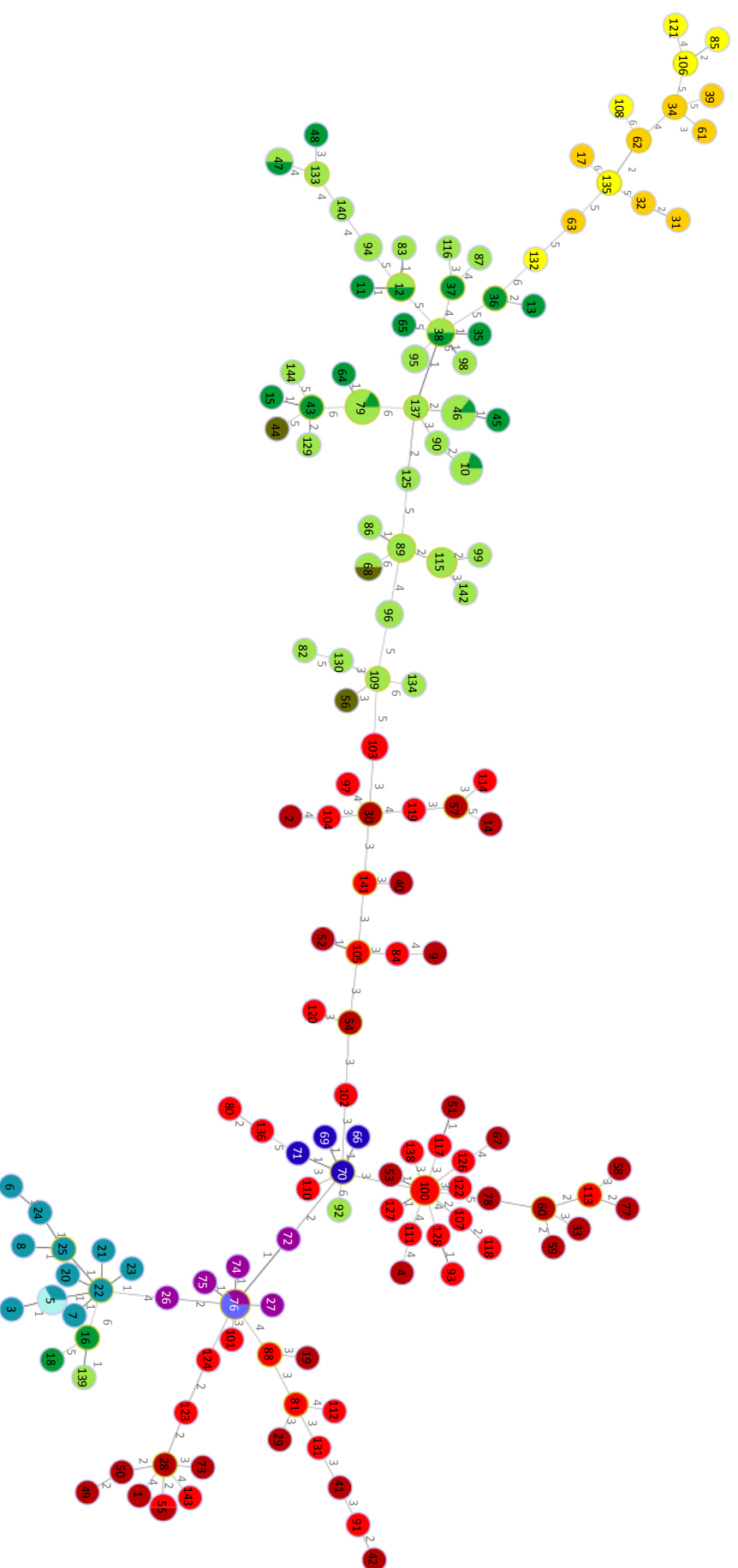
Como previsto pela maior partilha de alelos observada nos diagramas, os genes *map*, *pfl* e *tuf* apresentam correlações baixas por AW o que significa que o facto de duas estirpes terem o mesmo alelo não é indicativo de elas pertencerem à mesma espécie [*map* 0,513, IC95 (0,342-0,683); *pfl* 0,655 IC95 (0,548-0,762) e *tuf* 0,899 IC95 (0,807-0,992)]. Esta partilha manifesta-se nas espécies *anginosus* e *constellatus* que apesar de possuírem numerosos alelos próprios, têm também alelos comuns entre as espécies e subespécies, como por exemplo o alelo 14 de *map* ou alelo 30 de *pfl*. Contudo, ao contrário dos outros dois genes, *tuf* com uma diferença alélica nunca superior a 8pb destaca-se pela superior correlação ao nível da identificação final (espécie e subespécie: 0,870 IC95 (0,793-0,947)] enquanto *pfl* e *map* apresentam as correlações mais baixas [44,5% IC95 (0,313-0,577 e 31,7% (IC95 0,188-0,446) respetivamente].

Em relação às espécies e subespécies em particular, *S. intermedius* apresenta sempre uma clara separação dos restantes. A variação (em pb) intra-espécie é inferior, na maioria das vezes, à observada nas outras espécies e subespécies o que sugere estreita semelhança e homogeneidade nas estirpes desta espécie. As exceções, ocorridas em estirpes diferentes, são o gene *pyk* onde o alelo 22 é partilhado, como já referido, e o gene *rpoB*, onde o alelo 9, apesar de estar representado numa única estirpe, agrupa com apenas 2pb de diferença de *S. anginosus* subsp. *anginosus*, distante das estirpes do próprio *taxon*. Das estirpes mais prevalentes na amostra, *S. anginosus* subsp. *anginosus* apresenta maior heterogeneidade que *S. constellatus* subsp. *constellatus*, visto que as variações entre alelos da mesma subespécie são superiores, relacionando-se por vezes mais proximamente com alelos característicos de outros *taxa* (genes *rpoB* e *ppac*). Pelo contrário, *S. constellatus* subsp. *constellatus*, apesar de apresentar alguma partilha de alelos, é mais homogéneo e apresenta alelos próprios que aglomeram até 40 estirpes (alelo 10 de *tuf*). Em relação às subespécies minoritárias, *S. anginosus* subsp. *whileyi* está representado por alelos próprios nos genes *pyk*, *rpoB* e *sodA*. Nos restantes genes, *S. anginosus* subsp. *whileyi* distribui-se por alelos próprios e partilhados sendo a partilha inter-espécies (*map*, *pfl* e *tuf*) ou intra-espécie (*ppac*). *S. constellatus* subsp. *pharyngis* e *S. constellatus* subsp. *viborgensis* não apresentam um padrão de separação claro e partilham alelos em todos os genes. No entanto, observa-se a mesma separação que na análise dos STs relativamente aos genes *ppac* e *sodA*, em que a partilha ocorre apenas entre *S. constellatus* subsp. *pharyngis* da coleção invasiva do presente estudo e

*S. constellatus* subsp. *viborgensis* de Jensen *et al.*, estando *S. constellatus* subsp. *pharyngis* da coleção do autor representados por alelos diferentes destes. Nos genes *rpoB*, *pyk*, *map* e *pfl* a partilha ocorre também com estirpes de *S. constellatus* subsp. *constellatus*.

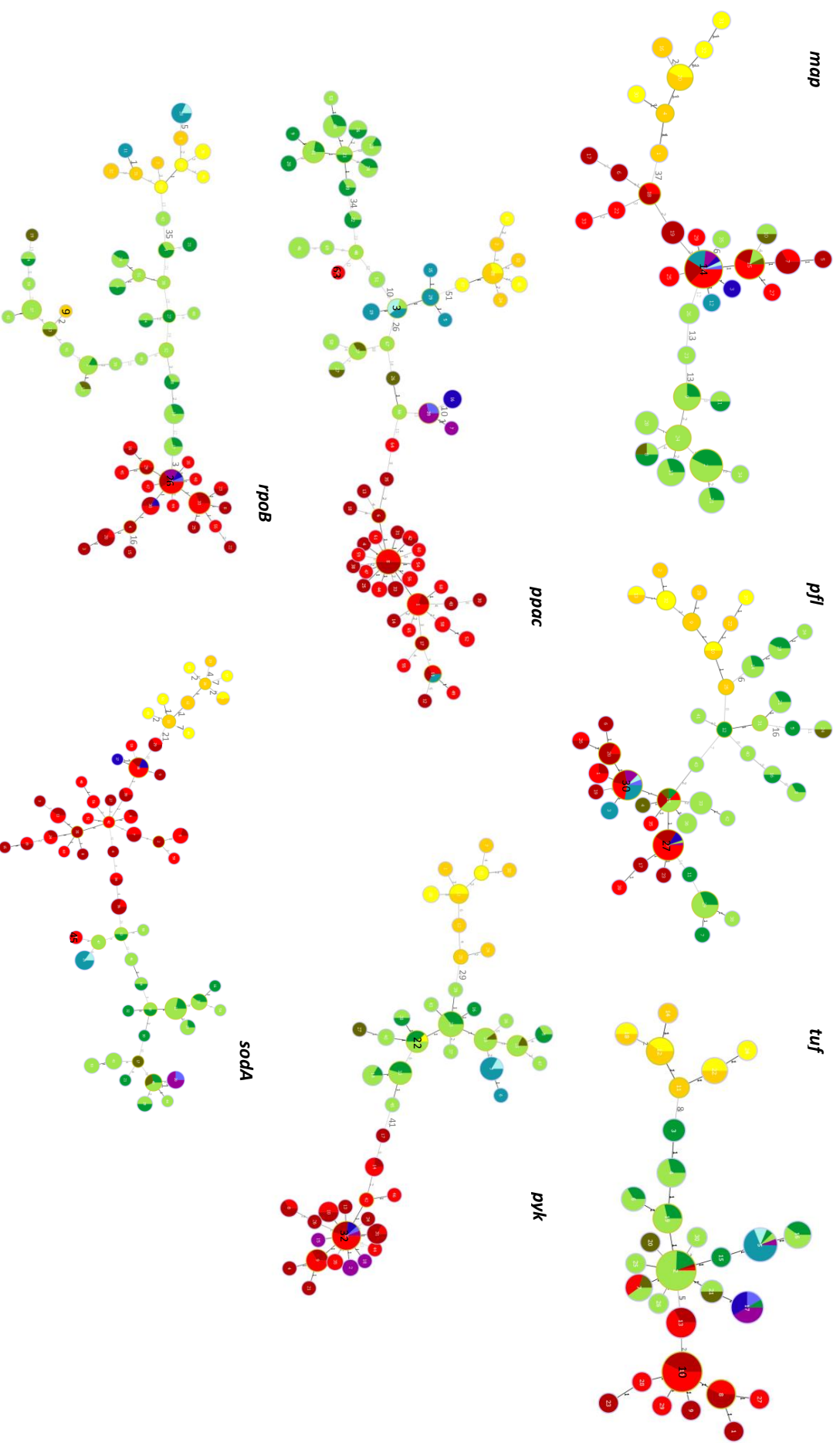
### 3.5.3 MLSA – análise das sequências concatenadas

Na figura 15 encontra-se o dendrograma obtido por “minimal evolution” (ME) através das sequências concatenadas dos sete genes. Observam-se três grupos facilmente distinguíveis que correspondem às três espécies de SAG. À esquerda o grupo de *S. constellatus* apresenta vários pequenos grupos sendo o mais próximo ao ponto de divisão central, o grupo homogêneo constituído por todas as estirpes de *S. constellatus* subsp. *viborgensis* caracterizadas por Jensen *et al.* (2013), e pelas duas estirpes de *S. constellatus* subsp. *pharyngis* da coleção invasiva em estudo, suportado por um elevado valor de “bootstrap” [100]. Estas duas estirpes apresentam a mesma sequência concatenada e por isso o mesmo ST, também comum com uma das estirpes de *S. constellatus* subsp. *viborgensis* do autor (ST76) (64). Os ST128 e ST83 intercalam-se entre este grupo e o grupo formado pelas estirpes de *S. constellatus* subsp. *pharyngis* da coleção de Jensen *et al.* (ST66, ST69, ST70 e ST71). Estes dois STs pertencem a estirpes sem grupo de Lancefield, o que indica que estas não podem pertencer a *S. constellatus* subsp. *pharyngis*. Com maior semelhança com os STs deste *taxon* encontra-se o ST122 que não agrupa em conjunto com os restantes *S. constellatus* subsp. *constellatus*. Os grupos mais exteriores e homogêneos são formados apenas por *S. constellatus* subsp. *constellatus* destacando-se, pela maior distância genética o ST127, no qual o gene *pyk* é a causa desta diferença. Na zona central inferior situam-se, bastante afastados geneticamente, as sequências que representam *S. intermedius*, divergindo duas delas mais cedo (ST17 e ST132) e as restantes agrupando com maior distância. À direita encontram-se as estirpes de *S. anginosus* onde se separam primordialmente as estirpes de *S. anginosus* subsp. *whileyi* suportadas por um valor de “bootstrap” de 86. Estas formam um grupo muito homogêneo entre si excetuando o ST20, uma estirpe de Jensen *et al.* que se distancia mais precocemente. Contrastando com a homogeneidade dos restantes grupos, observam-se as estirpes de *S. anginosus* subsp. *anginosus*. Embora distantes dos restantes grupos, separam-se em ramos de 2 a 8 STs nunca formando grupos coesos como no caso de *S. constellatus* subsp. *constellatus*.

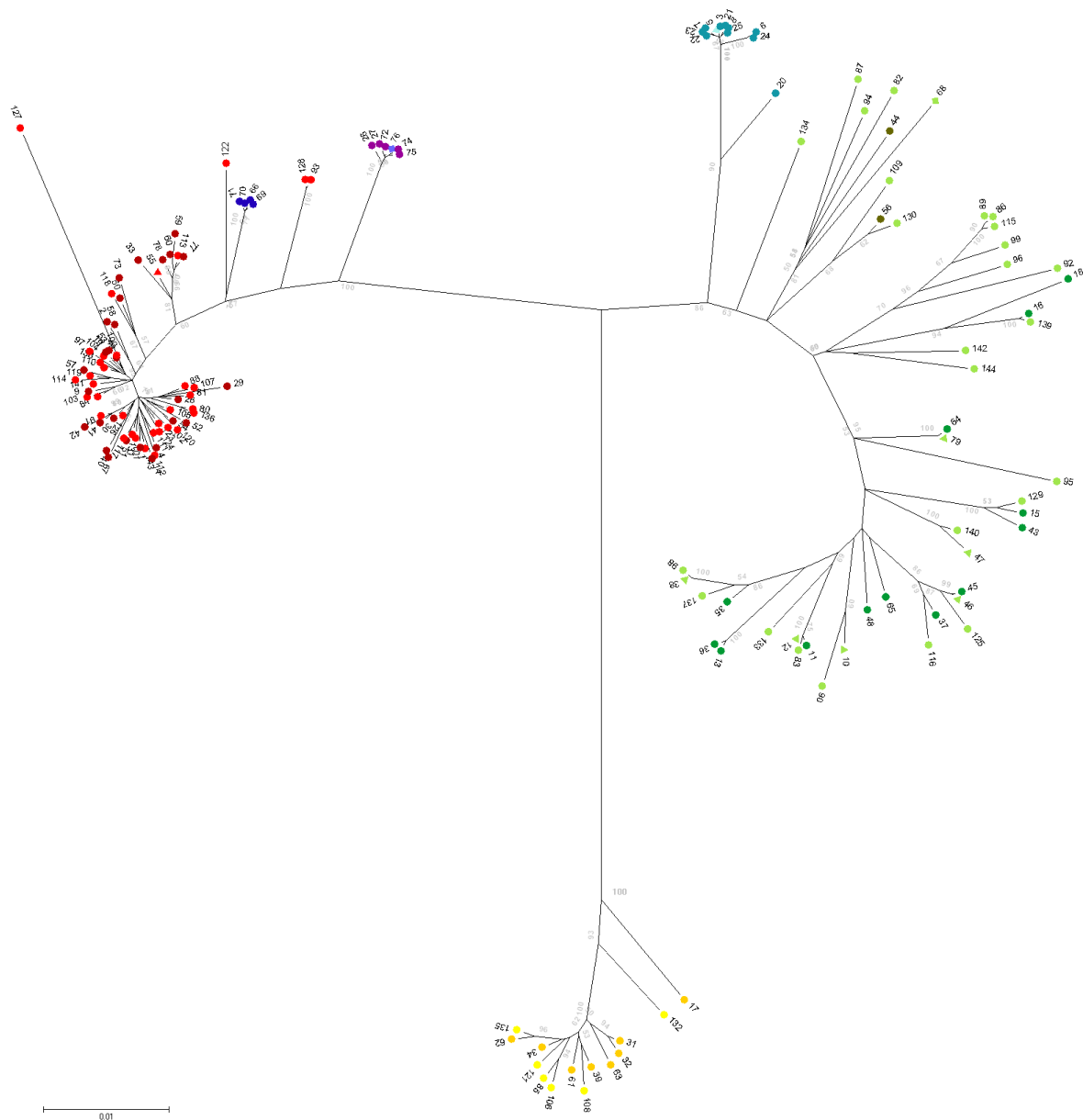


**Figura 13:** Diagrama de análise de perfis alélicos por MLST (PHYLOVIZ, goeBURST Full MST) de 177 estirpes de SAG, sendo 98 da coleção invasiva em estudo e 79 de Jensen *et al.* (64). Os perfis alélicos e STs de todas as estirpes analisadas encontram-se no quadro 25 em anexo. Cada círculo representa um ST único, cujo diâmetro é proporcional ao número de estirpes que o constituem. A numeração adjacente às linhas que unificam os STs, corresponde ao número de alelos de diferença.

Coleção invasiva em estudo: *S. anginosus* subsp. *anginosus* ■; *S. anginosus* subsp. *whiteyi* ■; *S. constellatus* subsp. *constellatus* ■; *S. constellatus* subsp. *pharyngis* ■; *S. constellatus* subsp. *constellatus* ■; *S. constellatus* subsp. *viborgensis* ■; *S. constellatus* subsp. *pharyngis* ■; *S. constellatus* subsp. *constellatus* ■.



**Figura 14:** Diagrama em função das sequencias alélicas de cada um dos sete genes que constituem o MLSA (PHYLOVIZ, goeBURST Full MST), das 98 estirpes da coleção invasiva e 79 estirpes de Jensen *et al.* (64). A numeração no interior dos círculos corresponde ao número do alelo, em cada gene, e a numeração adjacente à linha cinza que unifica os alelos corresponde ao número de pares de base de diferença. O diâmetro do círculo é proporcional ao número de estirpes que o constituem. As cores estão de acordo com a legenda da figura 13. Foram destacados a preto os alelos referidos nas seções 3, 5, 2 e 4, 3.



**Figura 15:** Dendrograma de MLSA por concatenação das sequências. Método de “minimal evolution” e “bootstrapping” com 1000 replicações, modelo de evolução de Kimura 2-parametros (programa MEGA). De seguida apresenta-se a legenda das cores e símbolos utilizados.

		Coleção estudo	Coleção Jensen <i>et al.</i>	Coleção estudo + 1 estirpe Jensen <i>et al.</i> (2013)
<i>S. anginosus</i>	<i>S. anginosus</i> subsp. <i>anginosus</i>	●	●	▲
	<i>S. anginosus</i> subsp. <i>whileyi</i>	●	●	▲
	<i>S. anginosus</i> genomosubspecies <i>AJI</i>		●	
<i>S. constellatus</i>	<i>S. constellatus</i> subsp. <i>constellatus</i>	●	●	▲
	<i>S. constellatus</i> subsp. <i>pharyngis</i>	●	●	
	<i>S. constellatus</i> subsp. <i>viborgensis</i>	—	●	
<i>S. intermedius</i>		●	●	

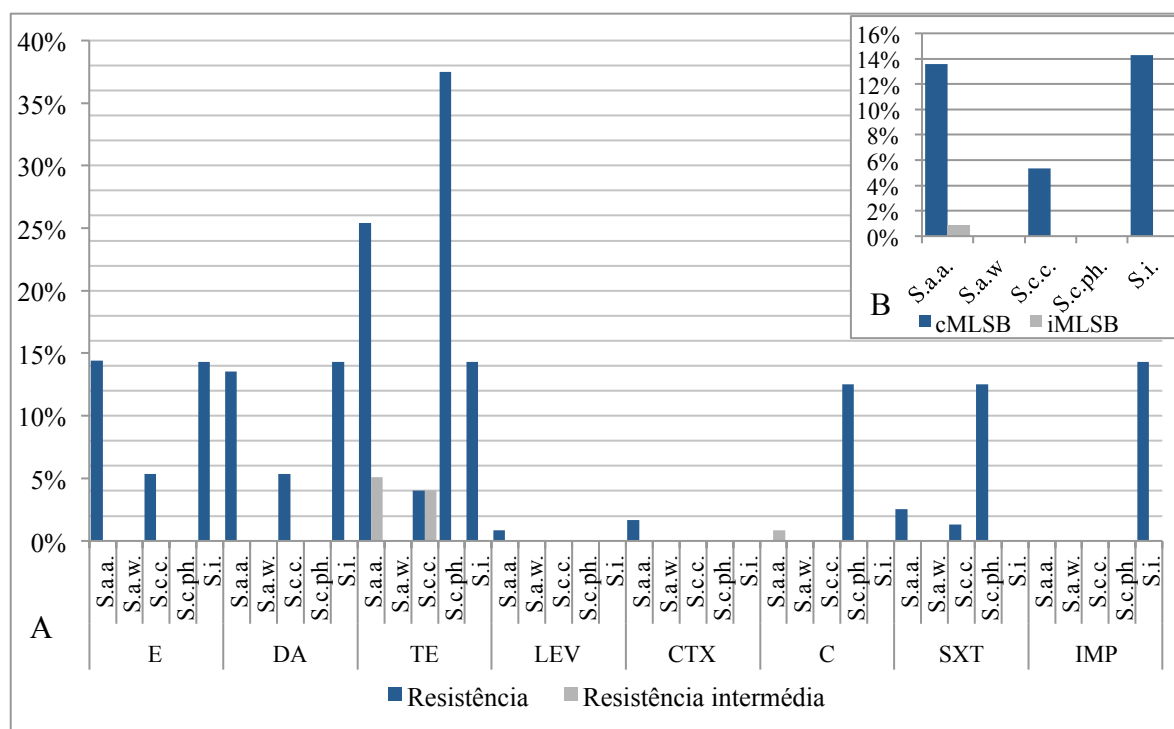
Nota: Os símbolos ◆ e ◆ correspondem a um ST cada, que representa no primeiro caso duas estirpes, um *S. anginosus* subsp. *anginosus* da coleção invasiva e um *S. anginosus* genomosubspecies *AJI* da coleção de Jensen *et al.* No segundo caso representa três estirpes, sendo duas *S. constellatus* subsp. *pharyngis* da coleção invasiva e uma *S. constellatus* subsp. *viborgensis* da coleção de Jensen *et al.*

### 3.6 Determinação da suscetibilidade aos antimicrobianos

Este grupo de estreptococos é na maioria suscetível aos antibióticos testados. Observou-se 100% de suscetibilidade em todos os *taxa* para vancomicina, linezolid, quinupristina-dalfopristina, gentamicina, estreptomicina, ceftriaxona e penicilina, por isso estes antimicrobianos não foram alvo de representação gráfica na figura 16A. Como se pode observar nesta figura apenas uma estirpe de *S. anginosus* subsp. *anginosus* (0,85%) apresentou perfil de resistência à levofloxacina e apenas duas da mesma subespécie (1,7%) o revelaram para a cefotaxima. Para o clorafenicol uma estirpe de *S. anginosus* subsp. *anginosus* apresentou resistência intermédia e uma de *S. constellatus* subsp. *pharyngis* (12,5%) foi resistente. Os resultados para o imipenemo revelaram que apenas uma estirpe de *S. intermedius* (14,3%) obteve este perfil. Ainda com níveis baixos de resistência o antibiótico cotrimoxazole apresentou cinco estirpes resistentes, sendo três de *S. anginosus* subsp. *anginosus* (2,5%) e uma de cada uma das subespécies de *S. constellatus*. Por fim, os antibióticos que apresentaram níveis superiores de resistência foram a eritromicina com 10,3% de estirpes resistentes, representando 14,4% das estirpes de *S. anginosus* subsp. *anginosus* (17/118), 5,3% de *S. constellatus* subsp. *constellatus* (4/75) e 14,3% das estirpes de *S. intermedius* (1/7); a clindamicina com 9,86% de estirpes resistentes, 13,6% dos *S. anginosus* subsp. *anginosus* (16/118), 5,3% de *S. constellatus* subsp. *constellatus* (4/75) e uma estirpe de *S. intermedius* (14,3%); e a tetraciclina com os níveis de não suscetibilidade mais elevados, 21,6% [resistência (17,4%); resistência intermédia (4,2%)] , sendo 30,0% das estirpes de *S. anginosus* subsp. *anginosus* (36/121), 8,0% de *S. constellatus* subsp. *constellatus* (6/75), 37,5% de *S. constellatus* subsp. *pharyngis* (3/8) e uma estirpe de *S. intermedius* (14,3%). *S. anginosus* subsp. *whileyi* (n=5) foi o único *taxon* que apresentou suscetibilidade a todos os antimicrobianos. *S. anginosus* subsp. *anginosus* é a espécie com maior probabilidade de apresentar resistência aos antibióticos eritromicina e tetraciclina com associação estatisticamente significativa ( $p=0,044$  e  $p\leq 0,005$  respetivamente). Foi também analisado o fenótipo de resistência aos macrólitos (figura 16B). Assim *S. anginosus* subsp. *anginosus* é o *taxon* que apresenta a maior percentagem de estirpes com o perfil cMLS<sub>B</sub> representado 13,6% das estirpes desta subespécie. Foi também este o único *taxon* onde se observou uma estirpe com fenótipo indutível (iMLS<sub>B</sub>) para a resistência à clindamicina. *S. constellatus* subsp. *constellatus*



apresentou quatro estirpes com fenótipo cMLS<sub>B</sub> (5,3%) das quais uma apresentava também resistência à tetraciclina. Por fim uma estirpe de *S. intermedius* (14,3%) apresentou fenótipo cMLS<sub>B</sub>. Nenhuma estirpe apresentou o fenótipo M. A multirresistência foi rara, como se pode observar pelo quadro 24. Esta foi encontrada em 17 estirpes: um caso de resistência conjunta à tetraciclina, cefotaxima e cloranfenicol; um caso de resistência conjunta à eritromicina, cotrimoxazole e resistência indutível à clindamicina e 15 casos de resistência à eritromicina, clindamicina e tetraciclina.



**Figura 16:** Percentagem de não suscetibilidade aos antimicrobianos em SAG (A). Fenótipo de resistência MLS<sub>B</sub> (B). “E” - Eritromicina; “DA” - Clindamicina; “TE” - Tetraciclina; “LEV” - Levofloxacina; “CTX” - Cefotaxima; “C” - Cloranfenicol; “SXT” - Cotrimoxazole; “P” - Penicilina; “IMP” - Imipenemo. S.a.a. - *S. anginosus* subsp. *anginosus*; S.a.w. - *S. anginosus* subsp. *whileyi*; S.c.c. - *S. constellatus* subsp. *constellatus*; S.c.ph. - *S. constellatus* subsp. *pharyngis*; S.i. - *S. intermedius*.

**Quadro 24:** Não suscetibilidade a múltiplos antimicrobianos.

Antibiótico	n	Taxon
E+DA + TE	15	<i>S. anginosus</i> subsp. <i>anginosus</i> (n=13) <i>S. constellatus</i> subsp. <i>constellatus</i> (n=1) <i>S. intermedius</i> (n=1)
E+DA	6	<i>S. anginosus</i> subsp. <i>anginosus</i> (n=3) <i>S. constellatus</i> subsp. <i>constellatus</i> (n=3)
E+DA(iMLS <sub>B</sub> )+SXT	1	<i>S. anginosus</i> subsp. <i>anginosus</i> (n=1)
TE + LEV	1	<i>S. anginosus</i> subsp. <i>anginosus</i> (n=1)
TE + CTX	1	<i>S. anginosus</i> subsp. <i>anginosus</i> (n=1)
TE+C	1	<i>S. constellatus</i> subsp. <i>pharyngis</i> (n=1)
TE + CTX + C	1	<i>S. anginosus</i> subsp. <i>anginosus</i> (n=1)

#### 4. Discussão e Conclusões

---

##### 4.1 Caraterização das estirpes

No presente estudo foram analisadas 213 estirpes de SAG, das quais unicamente 99 tinham identificação pelos laboratórios de rotina ao nível da espécie e em apenas 50,5% dos casos esta era a espécie correta. Das subespécies descritas a partir de 1999, nenhuma estirpe tinha identificação correta ao nível da espécie. Esta amostra enfatiza a problemática que tem sido sublinhada por vários autores de que a identificação hospitalar, por métodos fenotípicos, pode levar a identificações erróneas neste grupo (4, 75). Desta incapacidade podem resultar falhas no tratamento empírico, o que realça a importância da definição de métodos de identificação fidedignos, aplicáveis na rotina hospitalar.

A literatura indica que SAG causam infeção em todo o corpo, embora prevaleçam as recolhas em infeções por abscessos seguidas de casos de bacteriémia sem foco aparente (21, 102). Embora na nossa amostra não seja possível, em muitos casos, saber a origem exata da infeção, mas apenas qual o produto biológico de onde as bactérias são isoladas, estas associações também foram observadas no presente estudo dado que a fonte primária de recolha das estirpes foi o pus (n=90), produto de eleição em infeções localizadas como abscessos, seguido do sangue (n=64). *S. anginosus* foi a espécie predominante no sangue tal como referido por Clarridge *et al.* (21, 22). No entanto, os mesmo autores afirmaram que existia um número baixo de estirpes de *S. constellatus* e *S. intermedius* provenientes desta fonte, ao contrário dos resultados obtidos no presente estudo. Aqui, um terço dos *S. constellatus* subsp. *constellatus* foram isolados de amostras de sangue, o que corresponde a 39,1% das estirpes recolhidas desse local, e cinco das sete estirpes de *S. intermedius* presentes no estudo, tiveram esta origem, com uma associação estatisticamente significativa. Esta associação pode ser explicada pela propensão de *S. intermedius* para causar abscessos profundos principalmente no SNC e hepáticos (21, 35, 39), que levarão a uma identificação mais tardia do foco da infeção acabando esta por ser detetada primeiramente por hemocultura. É também referida como a espécie mais patogénica entre os SAG, o que justifica a associação significativa encontrada entre *S. intermedius* e a infeção invasiva. Apesar de o estudo não ter sido delineado de forma a rastrear co-infeção, ocorreram dois casos em que pela morfologia

foram identificados dois tipos de colônias diferentes, passíveis de serem do grupo SAG, na mesma amostra. Testadas por PCR comprovou-se a existência de dois *taxa* diferentes na amostra, como já tinha sido observado por Flynn *et al.* (35), sendo em ambos os casos uma estirpe de *S. anginosus* subsp. *anginosus* e uma de *S. constellatus* subsp. *constellatus*. Não foi ainda encontrado nenhum mecanismo de patogenecidade que favoreça a infecção destes dois *taxa* que não esteja presente em *S. intermedius* mas, pelo contrário, este último apresenta intermedilisina, um importante fator de virulência. Assim, a baixa proporção de estirpes de *S. intermedius* na nossa coleção, tal como encontrada noutros estudos (22, 76), pode ser justificada por uma menor colonização do Homem por esta espécie, o que reduziria a possibilidade de ser um agente oportunista, no entanto, são necessários outros estudos epidemiológicos a fim de esclarecer esta observação. De acordo com o esperado, a subespécie *pharyngis* apresentou associação estatística com amostras de exsudados faríngeos embora tenha sido encontrado noutros locais (64, 124). *S. anginosus* subsp. *whileyi*, associados anteriormente com infecções na orofaringe (64), associou-se igualmente a isolamento de exsudados faríngeos.

Estiveram presentes nas estirpes da nossa amostra os antigénios: A, C, F e G de Lancefield. Contudo, mais de um terço das estirpes não apresentaram qualquer antigénio e mais de 75% das estirpes não apresentaram  $\beta$ -hemólise (33). *S. anginosus* subsp. *anginosus* apresentou-se de acordo com as características referidas na literatura (33), à excepção das estirpes  $\beta$ -hemolíticas onde nenhuma estirpe possuía o antigénio C mas uma apresentou o antigénio A de Lancefield. *S. anginosus* subsp. *anginosus* foi também o único *taxon* com antigénio A e G de Lancefield (22, 33). *S. constellatus* subsp. *constellatus* apenas apresentava no estudo de Facklam *et al.*, grupo F ou ausência de grupo de Lancefield, independentemente da hemólise. No presente estudo, apesar de a maioria das estirpes estar de acordo com o descrito, uma estirpe possuía antigénio C de Lancefield, na qual a ausência de  $\beta$ -hemólise exclui a hipótese de pertencer à subespécie *pharyngis*. As estirpes de *S. intermedius* eram todas não- $\beta$ -hemolíticas e sem grupo de Lancefield, embora outros autores referissem que podiam ser  $\beta$ -hemolíticas (33) ou apresentar grupo F de Lancefield (22). Ainda assim, é muito provável que a hemólise neste *taxon* seja causada apenas pela intermedilisina, que apenas lisa eritrócitos humanos, o que exclui a hipótese de estas estirpes poderem apresentar  $\beta$ -hemólise em sangue de carneiro (3, 83, 84). *S. constellatus* subsp. *pharyngis* e *S. anginosus* subsp.

*whileyi* apresentaram-se de acordo com o descrito por diversos autores sendo todas as estirpes  $\beta$ -hemolíticas e expressando o grupo C de Lancefield (33, 64, 124). As diferenças observadas em *S. anginosus* subsp. *anginosus* e *S. constellatus* subsp. *constellatus* podem ser devidas à maior diversidade de estirpes presentes na nossa amostra relativamente às estudadas anteriormente. Pelo contrário, em *S. intermedius*, o número reduzido de estirpes presentes na amostra, pode ter diminuído a variabilidade. Mais estudos são necessários para clarificar o padrão fenotípico, dado que a maioria apenas caracterizou as estirpes ao nível da espécie. No presente estudo, algumas estirpes sem hemólise em colónias isoladas, apresentavam coloração verde na zona de maior inóculo, sugerindo  $\alpha$ -hemólise, já referida por Clarridge *et al.* (22).

Em relação à caracterização dos doentes, observou-se uma associação entre a recolha de estirpes nos produtos provenientes de infeção invasiva e a população idosa. Assim, nesta população com um sistema imunitário mais debilitado, as estirpes parecem conseguir invadir com mais facilidade, destacando-se a recolha de estirpes no sangue. A recolha de SAG em pus está contudo associada à faixa etária dos adultos. Por outro lado em crianças são mais frequentes as infeções não invasivas. De facto, das sete estirpes de *S. intermedius*, associadas a infeção invasiva, quatro provinham de idosos e nenhuma de crianças. Já *S. anginosus* subsp. *whileyi* e *S. constellatus* subsp. *pharyngis* predominam na infeção não invasiva e não foram recolhidos de idosos. No entanto, não se verificou qualquer associação entre *taxa* e faixas etárias, apenas com o tipo de infeção. Também quanto ao género não existiram associações estatísticas com nenhum produto ou *taxon*.

#### 4.2 Métodos de identificação

O “gold standard” assumido no presente estudo baseou-se nos estudos realizados por Takao *et al.* (108, 109) com a proposta de um esquema em dois passos para identificação de SAG e que foi utilizado também por outros autores (36, 106). Num primeiro passo são utilizados iniciadores específicos para o grupo (gene da *pbp2b*). Obtendo-se um resultado positivo prossegue-se para o segundo passo, um conjunto de iniciadores utilizados em “multiplex” que permitem identificar cada um dos *taxa* do grupo. Contudo, de forma a garantir alguma segurança do método que seria considerado o “gold standard” no presente estudo, foram sempre realizadas as duas reações de PCR independentemente do resultado da primeira. Três estirpes foram excluídas da análise e, ao contrário do observado por Takao *et al.*, uma estirpe  $\gamma$ -hemolítica do grupo A de

Lancefield mostrou amplificação de um fragmento de tamanho inferior ao esperado com os iniciadores do grupo (109). Contudo a estirpe não produziu qualquer fragmento com nenhum dos iniciadores de espécie ou subespécie, o que comprova que não pertencia a SAG. No segundo caso a estirpe não amplificou na primeira reação de PCR mas produziu um fragmento na segunda reação que, isoladamente, seria indicativo de a estirpe pertencer a *S. constellatus* subsp. *pharyngis*, fragmento que será sequenciado a fim de verificar a identidade do gene amplificado. Por fim, na última estirpe ocorreu amplificação inespecífica para o segundo PCR sem amplificação para o primeiro. Ainda assim, casos semelhantes, de amplificação inespecífica na segunda reação, tinham já sido descritos e poderão dever-se às impurezas existentes, decorrentes do método de extração do DNA por fervura da células (109).

Foi ainda possível confirmar os resultados da estirpe de “DNA group 2” (atual *S. anginosus* subsp. *whileyi*), na qual o autor tinha descrito a amplificação de dois fragmentos, um através dos iniciadores para o *rRNA 16S* de *S. anginosus* e outro com o tamanho correspondente à hialuronidase monofuncional de *S. constellatus* subsp. *constellatus* (109). No entanto, não se confirmou ainda a pequena diferença de tamanho referida para o produto amplificado de *rRNA 16S* nem o tamanho exato do produto dos iniciadores do gene da hialuronidase, visto que não foi ainda feita sequenciação.

O método aqui testado foi utilizado numa coleção de estirpes, das quais 213 pertenciam ao grupo SAG e provou a robustez necessária para ser considerado um método de referência, mostrando resultados reprodutíveis e claros, segundo as condições otimizadas. Contudo, era importante comparar este método tão promissor, tanto com os métodos passíveis de utilização no diagnóstico em microbiologia clínica (Rapid ID 32 Strep e MALDI-TOF), como com o método de referência atual, definido por Whiley *et al.* em 1990. Como já foi explicado, deste último método selecionaram-se as cinco enzimas com maior poder de diferenciação entre os *taxa* do grupo, de acordo com os resultados de Limia *et al.* e Facklam *et al.* (33, 75). Foram comparados com o descrito por este último estudo por ser o mais atual que contemplava já a discriminação das subespécies recentes (33). Em função dos intervalos considerados por Facklam *et al.*, os resultados apresentados no presente trabalho são concordantes na maioria dos casos. Apesar de as duas subespécies de *S. anginosus* não serem distinguíveis por este método (ambas degradam apenas  $\beta$ -GLU), observaram-se resultados perto de 100% na

identificação ao nível da espécie. Os resultados corresponderam ao perfil esperado no caso de *S. intermedius*, mas ficaram aquém do esperado para as subespécies de *S. constellatus*. *S. intermedius* é de facto o *taxon* mais reativo originando uma boa identificação enzimática (122). No entanto, esta afirmação também deveria verdadeira para *S. constellatus* subsp. *pharyngis*, o que não se verificou uma vez que, para os substratos  $\beta$ -GLU,  $\beta$ -NAGA e  $\beta$ -FUC observaram-se resultados “variáveis”, diferentes do esperado (positivos). Na subespécie *constellatus*, as discrepâncias ocorreram com os substratos  $\alpha$ -GLU e  $\beta$ -GLU, nos quais as estirpes apresentaram resultados no intervalo “variável”, em vez de positivo ou negativo respetivamente. Estes resultados implicaram que pela ausência de degradação de  $\alpha$ -GLU, com ou sem degradação de  $\beta$ -GLU, mais de um quarto das estirpes de *S. constellatus* subsp. *constellatus* tivessem uma identificação incorreta. No entanto, considerando estes resultados como o perfil correto para ambas as subespécies de *S. constellatus*, tornar-se-ia impossível distinguir estas *taxa* entre si e de *S. anginosus*. Limia *et al.* (2000) descreveram também divergências ao nível da  $\alpha$ -GLU, mas sugerem que *S. anginosus* deverá ser considerado negativo (75), o que não foi observado no nosso estudo onde o resultado foi “variável”, como inicialmente proposto. Por outro lado, mesmo com os critérios de Facklam *et al.* (2002), este método assume que se considere uma espécie positiva ou negativa com uma margem de até 8% de estirpes discordantes (33). Assim, este método não garante uma identificação correta da totalidade das estirpes, apresentando provavelmente fraca sensibilidade para estirpes menos reativas. Este problema foi observado para *S. anginosus* subsp. *anginosus*, cuja identificação depende inteiramente do resultado positivo para a  $\beta$ -GLU, dado que na degradação dos outros substratos é esperado um resultado variável ou negativo. Assim, as duas estirpes que não degradaram  $\beta$ -GLU foram mal classificadas. Por outro lado, Ahmet *et al.* (1995) sugerem que algumas reações podem ser afetadas pelas condições de incubação, como a presença de oxigénio, a mistura reacional e tamanho do inóculo. Neste trabalho verificou-se que o tempo de incubação afetava também a visualização de reação pois quando este era superior havia já reações inespecíficas. O inóculo utilizado estava à turbidez de 1 McFarland, tal como sugerido por Limia *et al.*, diferente do 4 McFarland aconselhado por Ahmet *et al.* A incubação prévia das colónias foi feita aerobicamente em TSA, diferindo a atmosfera de incubação do segundo autor e o meio de ambos (1, 75). Esta pode ser a razão para a

discrepância observada para a  $\alpha$ -GLU em *S. constellatus* subsp. *constellatus*, uma vez que o inóculo pode ter sido demasiado fraco para a detecção de reação. Para Rapid ID 32 Strep, também baseado em reações enzimáticas, está descrito que a reação pode ser influenciada pelo meio de incubação do pré-inóculo, não sendo recomendada a utilização de TSA ou MH. Todos estes fatores, aliados às diferenças geográficas das populações analisadas, poderão estar na origem das divergências encontradas no presente estudo. Estas razões poderão justificar igualmente o facto de alguns autores apresentarem resultados não consensuais, levando a identificações incorretas (22, 105), como a degradação de  $\beta$ -FUC por *S. anginosus*, apenas descrita por Summanem *et al.* (22, 105). Talvez devido às condições alteradas para a adaptação ao teste simples e rápido utilizado nos dois estudos, Fluo-Card *Milleri*<sup>®</sup>, os autores indicam que este teste, baseado no método de referência, não apresenta resultados fidedignos (22, 105). Para além disso, apenas com os três substratos incluídos no teste seria impossível diferenciar *S. constellatus* subsp. *pharyngis* de *S. intermedius*, sendo necessário adicionar pelo menos o substrato  $\alpha$ -ANA, para esta distinção. No presente estudo, este substrato correspondeu ao descrito tendo apenas sido degradado pelas estirpes de *S. intermedius*. Este método foi descrito como método de referência para o grupo SAG em 1990 e tem sido mantido desde então. Com a alteração da população de SAG, que provavelmente ocorreu no espaço de mais de 20 anos, outros autores têm corrigido os perfis de cada espécie e acrescentado o fenótipo para novos *taxa* (33, 75). Contudo, dada a evolução verificada no campo do diagnóstico, e o aparecimento de novas técnicas, principalmente moleculares, com maior sensibilidade, é plausível considerar a substituição do método de referência. Se por um lado, os métodos moleculares apresentam resultados mais fidedignos e terão, num futuro próximo, de ser implementados no diagnóstico de rotina, eles são muitas vezes dispendiosos, implicando por vezes técnicos mais especializados. De seguida, será por isso apresentada a análise dos resultados de Rapid ID 32 Strep e MALDI-TOF, dois métodos passíveis de aplicação na rotina microbiológica clínica. Observa-se que o Rapid ID 32 Strep apresenta maior proporção de estirpes corretamente identificadas, mas revela também discrepâncias graves, identificando estirpes de SAG como pertencendo a outros géneros (11,8%). Neste método, algumas provas suscitam dúvidas na leitura automática e são inconclusivas, o que prejudica a reprodutibilidade. De acordo com Limia *et al.* (2000), *S. intermedius* foi a espécie mais discordante (75,

105), e contrariamente ao descrito, *S. constellatus* subsp. *constellatus* foi a espécie mais concordante. Embora estejam descritos resultados satisfatórios, estes são em torno dos 70% de concordância com o método enzimático ou com métodos genotípicos (75, 105). A grande variabilidade bioquímica intra-grupo e principalmente intra-*taxon*, pode ser a base destes resultados, não permitindo uma identificação inequívoca (31, 52). Devido à natureza bioquímica do método, é o que se associa mais, no presente estudo, com o método enzimático de Whiley *et al.* (122). Também o facto de algumas estirpes obterem resultados negativos em reações para as quais todos os SAG são positivos, como VP, sugere que sendo estas estirpes pouco reativas e de crescimento lento, o teste poderia ser melhorado por um aumento do inóculo, do tempo de incubação, ou pela incubação da mistura na presença de CO<sub>2</sub> (1). No entanto, estas alterações teriam que ser testadas nos restantes *Streptococcus* para não comprometer a fiabilidade do teste na identificação de outras espécies do género. Além disso, este método está intimamente dependente da base de dados, nem sempre de acordo com a taxonomia em vigor, principalmente nos *Streptococcus* não hemolíticos cuja taxonomia ainda não é totalmente clara. Assim, nem todas as subespécies estão incluídas. É o caso de *S. constellatus* subsp. *pharyngis*, para a qual foram encontradas estirpes que fazem referência à possibilidade de pertencer a este *taxon*, mas que ainda não consta na classificação final.

O MALDI-TOF pelo contrário é uma técnica mais robusta e, apesar de possuir uma proporção inferior de identificações corretas, quando considerado apenas ao nível da espécie, obteve resultados muito superiores. Contudo, a pequena dimensão das colónias e o deficiente crescimento, tornam por vezes o método inexequível com apenas 24h de incubação. Nestas circunstâncias é difícil obter uma amostra sem que esta esteja muito contaminada com meio de cultura, o que pode influenciar o resultado, quer na identificação obtida, quer na qualidade da mesma. Para além disso, o método necessita na maior parte das bactérias de apenas um colónia, mas no caso particular de SAG isto não é possível, o que realça a importância de ser feita a identificação a partir de uma cultura pura. Assim, para reduzir estes problemas, o método deve ser aplicado sempre com 48h de incubação, preferencialmente em anaerobiose e em CBA. Também a variabilidade de espectros num mesmo *taxon* inerente à técnica, associado ao facto de uma mesma amostra nunca originar dois espectros exatamente iguais (127), faz com que o número de espectros presente na base de dados afete os resultados. Se Wieser *et al.*



afirmam que se pode obter identificações bastante fiáveis quando presentes vários espectros da mesma espécie na base de dados (127), pelo contrário quando, à semelhança do presente trabalho, apenas está presente, para o grupo SAG, uma a duas estirpe de cada *taxon*, muita da fiabilidade e grau de certeza são perdidos.

Ainda assim, o MALDI-TOF é de todos, o método mais abrangente, incluindo todo o espectro de bactérias e que até agora comprova ter resultados mais fidedignos (36, 127). As divergências apresentadas, maioritariamente ao nível da subespécie, representam um erro de menor gravidade que se deve talvez a uma semelhança dos espectros como consequência da proximidade das proteínas ribossomais entre as subespécies, mas que tem repercussões menos graves no diagnóstico etiológico. Deste modo, apesar de não ser claro qual o método não genotípico ideal para distinguir melhor todo o grupo SAG, dado que diferentes *taxa* são melhor identificados com diferentes métodos, o MALDI-TOF parece aproximar-se mais de uma identificação real, útil para o diagnóstico, tal como descrito (36). É prático, de execução simples e rápida. No entanto, está ainda longe de conseguir separar todos os *taxa* de SAG com classificações altas. Para tal julgamos ser necessário a introdução de espectros da subespécie *whileyi* e um reforço dos restantes *taxa* na base de dados, que poderá resolver o problema das identificações discrepantes dentro do grupo.

### 4.3 Taxonomia

Desde 1991 SAG inclui três espécies fenotipicamente e geneticamente distintas: *S. anginosus*, *S. intermedius* e *S. constellatus* (119, 126). A distinção destas espécies foi muitas vezes debatida e, ainda que com ligeiras diferenças entre os métodos de separação e identificação, esta divisão é agora consensual. Do mesmo modo, na análise das sequências concatenadas por ME observa-se, no presente trabalho, um ponto de divisão de onde divergem três ramos principais, correspondendo às estirpes de cada uma das três espécies. Esta divisão torna-se mais clara do que no caso de Jensen *et al.* (2013) em que os três ramos não se diferenciam em função da espécie (64).

Ambas as análises com os genes de MLSA confirmaram que *S. anginosus* subsp. *anginosus* é o *taxon* mais diverso (22). Apesar do tamanho da amostra ser semelhante ao de *S. constellatus* subsp. *constellatus*, quando consideradas as duas coleções observa-se maior número de STs e de alelos de *S. anginosus* subsp. *anginosus*, mas também uma maior distância genética entre as estirpes (dendrograma de ME), o que provoca uma

maior dispersão. *S. intermedius*, apresenta também grande diversidade na análise por MLST, representando cada estirpe um único ST. É também o *taxon* que apresenta uma maior distância genética para os restantes *taxa*, assim como para o ancestral comum das estirpes analisadas, no dendrograma de MLSA. Assim, de acordo com os estudos de reassociação de DNA, utilizados habitualmente para definição filogenética (126), *S. intermedius* é o *taxon* mais divergente em SAG. Pela sua heterogeneidade, destacaram-se algumas estirpes. É o caso do ST127 de *S. constellatus* subsp. *constellatus* que, na análise das sequências concatenadas por MLSA, apresenta uma distância genética à origem bastante superior, devido a uma potencial recombinação apresentada no gene *pyk* (63pb de diferença para alelo mais próximo do mesmo *taxon*). Por outro lado, na análise dos STs por MLST, o ST92, ST16, ST18 e ST139 de *S. anginosus* subsp. *anginosus* agrupam distanciados das estirpes do seu *taxon*. A extensa diversidade da subespécie pode estar a ser responsável por este fenómeno, pois também são 6LV para os STs a que se ligam, comprovando que também não apresentam grande semelhança com estes. Assim, o facto de o ST92 estar ligado apenas a um ST de *S. constellatus* subsp. *pharyngis*, não impede que apresente a mesma diferença (6LV) com STs de *S. anginosus* subsp. *anginosus* como é o caso para o ST134, ST96, ST109 e ST130 (alelo *map* ou *pyk* em comum). Contudo, no dendrograma de ME, agrupam junto com *S. anginosus* subsp. *anginosus*, o que sugere que, embora existam pequenas diferenças na sequência, estas ocorrem em *loci* diferentes. A própria metodologia de MLST aplicada, pode estar neste caso a ser penalizadora pois a ligação apresentada depende assim do algoritmo goeBURST que, ao garantir que existe um diagrama único para cada conjunto de dados, utiliza regras de desempate que têm uma base evolutiva mas que poderão produzir diagramas que não traduzem a evolução real das estirpes.

Em relação às estirpes de referência utilizadas, estas agruparam conjuntamente com as estirpes do mesmo *taxon*. A exceção é a estirpe de *S. intermedius* que no gene *rpoB* terá sofrido provavelmente recombinação (alelo 9), e que, pela análise neste gene, seria classificada como *S. anginosus* subsp. *anginosus*, resultado já observado também por Hoshino *et al.* (52). A estirpe de referência de *S. anginosus* subsp. *anginosus* é representada pelo ST18, um dos STs mais divergentes desta subespécie.

Para a identificação filogenética com base num gene apenas, *sodA* e *rpoB* foram dois dos genes sugeridos (31, 93). No entanto como já foi discutido, também em *rpoB* foram

encontrados indícios de recombinação (52). Jensen *et al.* (2013) demonstraram que em nenhum dos genes “housekeeping” incluídos no esquema definido por Bishop *et al.* (2009), a topologia do dendrograma obtido era igual à da sequência concatenada dos sete genes para *S. dysgalactiae*, *S. pyogenes* e SAG (64, 65). Todos estes estudos sustentam a afirmação que, apesar de haver genes com menos variação, a identificação molecular baseada num único gene pode levar a identificações discordantes, e a análise filogenética nestes moldes não é recomendada (38, 52, 64, 65). Contudo, sendo impraticável a utilização de uma análise a múltiplos *locis* na prática clínica foi sugerido o gene *sodA*, com menor recombinação e consequentemente baixa frequência de desvios filogenéticos, para uma identificação com base num gene apenas (93). O nosso estudo apoia a utilização deste gene como será discutido abaixo. Surge também o problema de avaliar esquemas de identificação apenas por comparação de algumas estirpes, normalmente as estirpes tipo de espécies de *Streptococcus*, sem inclusão de uma amostra significativa de estirpes selvagens (52, 65). As estirpes selvagens apresentam afastamento, quer fenotípica quer genotipicamente, e uma evolução constante, existindo recombinação, enquanto as estirpes tipo, apresentam características que foram descritas aquando da identificação do *taxon*. Indícios de recombinação foram também observados no presente estudo, principalmente nos genes *map*, *pfl* e *tuf*, que se caracterizam por uma condensação do diagrama provocado pela presença de um menor número de alelos mas com maior partilha de um mesmo alelo entre diferentes espécies ou subespécies. No caso dos genes *ppac* e *pyk* apenas um alelo em cada foi partilhado por estirpes de espécies diferentes, existindo ainda partilha de alelos entre as subespécies de *S. anginosus* e de *S. constellatus* respetivamente. Os genes *rpoB* e *sodA*, nos quais se observou mais diversidade nas sequências são também os únicos nos quais não houve partilha de alelos entre espécies diferentes. Ainda assim, *S. constellatus* subsp. *constellatus* partilhou alelos com *S. constellatus* subsp. *pharyngis* em ambos os genes, o que comprova por um lado a fraca discriminação destes genes ao nível da subespécie em *S. constellatus* e por outro a proximidade genotípica existente entre as subespécies. Dado que foi sugerido que todas as espécies de SAG apresentam competência<sup>7</sup> (48, 49), este estado pode favorecer a recombinação alélica (52).

---

<sup>7</sup> Competência - capacidade de uma célula, acolher DNA extracelular e eficientemente substituir regiões homólogas no cromossoma, causando por vezes mudanças permanentes no seu fenótipo (47,48)

#### 4.3.1 *S. anginosus* subsp. *whileyi*, *S. constellatus* subsp. *pharyngis* e *S. constellatus* subsp. *viborgensis*

Em 1999, o mesmo autor que definiu as três espécies, reclassifica *S. constellatus* em *S. constellatus* subsp. *constellatus* e descreve *S. constellatus* subsp. *pharyngis*. Neste mesmo estudo é focado outro grupo de estirpes geneticamente distinto, “DNA group 2”, cuja ausência de um teste fenotípico que o pudesse diferenciar e ausência de um padrão de associação com infecções particulares ou locais anatómicos, impediam a sua descrição. Em 2004 Takao *et al.* não conseguiu estabelecer se o gene da hialuronidase encontrado na estirpe testada, em conjunto com a amplificação de um fragmento de *RNA 16S* de tamanho inferior ao de *S. anginosus* subsp. *anginosus*, poderia ser um método de diferenciação para todas as estirpes (109, 124) e deste modo só em 2013 Jensen *et al.* (64) descreve este e outro *taxon*, através da técnica de MLSA. Estes autores concluíram que as sequências concatenadas dos sete genes *map*, *pfl*, *ppac*, *pyk*, *rpoB*, *sodA* e *tuf* e a análise da sequência do espaço intergénico entre 16S e 23S do *rRNA*, assim como uma associação com a orofaringe humana, comprovavam a presença de uma população coerente e filogeneticamente distinta dentro da espécie *anginosus*. É ainda referido que, na maior parte dos genes, se observam alelos únicos para esta nova subespécie embora os dendrogramas apresentados não corroborem esta afirmação. Para além disso analisaram-se regiões parciais de 54 genes “housekeeping”, comuns a todo o grupo SAG, distribuídos pelo genoma, em 10 estirpes. Do mesmo modo que a análise filogenética por MLSA dos sete genes, a sequência concatenada (20504pb) estava de acordo com a distinção genómica para a subespécie então definida (64). No entanto, é importante notar que esta conclusão teve por base a análise de apenas 10 estirpes.

No presente estudo, iniciadores para o gene da hialuronidase e para o gene *rRNA 16S* de *S. anginosus* subsp. *anginosus* estavam incluídos no PCR, sendo *S. anginosus* subsp. *whileyi* o único *taxon* que poderia amplificar simultaneamente com estes dois conjuntos de iniciadores. Com a inclusão no estudo da estirpe de referência descrita por Jensen *et al.*, DSM25818<sup>T</sup>, como controlo, foi possível confirmar o padrão de amplificação descrito por Takao *et al.* (2004) para a estirpe MAS624 (usada também na descrição de Whiley *et al.*) (109, 124). Foram posteriormente identificadas cinco estirpes com o mesmo padrão pertencentes a este grupo. De acordo com todas as informações anteriores estas estirpes apresentavam todas β-hemólise e antigénio C de Lancefield.

Pelas identificações fenotípicas efetuadas, observaram-se diferenças nesta subespécie. Rapid ID 32 Strep, revelou algumas diferenças nas provas enzimáticas, sendo mais significativa a reação com  $\beta$ -GUR, com a qual 100% das estirpes de *S. anginosus* subsp. *whileyi* reagiram, mas apenas menos de 10% das estirpes de *S. anginosus* subsp. *anginosus* o fizeram. Também  $\beta$ -GLU, MAL e SAC apresentaram diferenças nos resultados da reação. Já a identificação final comprova o distanciamento fenotípico de *S. anginosus* subsp. *whileyi* das estirpes típicas de *S. anginosus*, uma vez que 60% foram classificadas como *Lactococcus lactis cremoris*, com 98% de confiança na identificação. Esta discrepância pode dever-se à lacuna na base de dados quanto ao padrão fenotípico para esta subespécie, que na ausência desta informação se aproxima mais do perfil de outros géneros. O MALDI-TOF por outro lado ao analisar a razão entre a carga e a massa das proteínas ribossomais, produzirá espectros que terão possivelmente maior tendência a refletir os resultados obtidos por sequenciação de *rRNA 16S* e não as metodologias fenotípicas (127). Assim, 100% das estirpes de *S. anginosus* subsp. *whileyi* do presente estudo foram identificadas como *S. anginosus* por semelhança ao espectro da subespécie *anginosus*, o que reflete a superior proximidade das proteínas ribossomais a *S. anginosus* do que aos outros *taxa* do grupo.

Por fim, a análise dos genes de MLSA, por ambos os métodos, comprova a grande coesão existente nas estirpes desta subespécie, sendo o *taxon* mais homogêneo. O dendrograma de MLSA permite mostrar que estas estirpes são filogeneticamente mais semelhantes a *S. anginosus* subsp. *anginosus*, apesar das divergências fenotípicas e genotípicas anteriormente mencionadas. O mesmo resultado não foi observado por MLST, reflexo da divergência genética destas estirpes, provavelmente em genes diferentes, gerando um perfil alélico bastante diferente. As estirpes possuem mais alelos em comum com a espécie *constellatus*, observado nos diagramas dos genes *map*, *pfl* e *tuf* do que com *S. anginosus* subsp. *anginosus*. Assim este grupo coeso, constituído pela subespécie *whileyi*, relacionou-se com *S. constellatus* subsp. *viborgensis*. O gene *ppac* é aquele em que se observa maior diversidade, mas é também o único que tem um alelo comum entre as subespécies *anginosus* e *whileyi*. Em *pyk*, *rpoB* e *sodA* observam-se alelos únicos para a subespécie, os mesmos genes onde tal já se tinha verificado (64).

A descrição desta subespécie implicou paralelamente a descrição de uma outra subespécie bastante heterogênea, *S. anginosus* subsp. *anginosus*, que dentro de SAG é o

*taxon* com maior diversidade genotípica como observámos, diversidade de nichos ecológicos e diversidade fenotípica, quer hemolítica quer quanto ao grupo de Lancefield. Esta heterogeneidade pode ser um fator impeditivo da separação de *S. anginosus* uma vez que *S. anginosus* subsp. *anginosus* terá já a classificação tão específica, subespécie, sem apresentar no entanto características ecológicas ou fenotípicas uniformes que caracterizem o *taxon*. No entanto, é também o único grupo de estirpes de SAG que não apresenta nenhum tipo de hialuronidase, característica unificadora da subespécie *anginosus* que não se estende à subespécie *whileyi*.

Deste modo existem de facto argumentos suficientes que defendem a classificação de *S. anginosus* em duas subespécies distintas, sendo a distinção laboratorial possível sem recurso ao MLSA (64, 109). Observam-se características unificadoras de *S. anginosus* subsp. *whileyi*, como é exemplo a coesão genotípica demonstrada pela separação precoce deste grupo, do ramo da espécie *anginosus*, no dendrograma de MLSA. A subespécie apresenta ainda colonização diferencial e homogeneidade fenotípica distinta de *S. anginosus* subsp. *anginosus*. Por último, destaca-se um importante fator de virulência, a hialuronidase com função de sulfatase da condroitina [tal como testado por Takao *et al.* (109)], que distingue esta subespécie de *S. anginosus* subsp. *anginosus*.

No estudo de Jensen *et al.* é ainda descrito *S. constellatus* subsp. *viborgensis*, uma linhagem próxima de *S. constellatus* subsp. *pharyngis* (64). Tal como *S. constellatus* subsp. *pharyngis* e *S. anginosus* subsp. *whileyi*, as estirpes são  $\beta$ -hemolíticas com grupo C de Lancefield e isoladas de infeções na orofaringe. Apresentam um padrão fenotípico diferente das duas subespécies de *S. constellatus*, dado que não possuem  $\beta$ -galactosidase (testada pelo ONPG), ao contrário de *S. constellatus* subsp. *pharyngis*, mas produzem  $\beta$ -D-glicosidase, que a subespécie *constellatus* não produz (64). Possuem uma sequência única para o gene *rRNA 16S* e a distância genética permite distinguir estas subespécies (64). *S. constellatus* subsp. *viborgensis* foi um caso particular neste trabalho dado que a descrição ocorreu no seu decorrer e, até essa data, este grupo de estirpes não tinha sido destacado por nenhum autor, pelo que não foi feita a sua diferenciação fenotípica. No estudo de Jensen *et al.*, a cisão do ONPG, parece ser o único teste capaz de diferenciar *S. constellatus* subsp. *viborgensis* da subespécie *pharyngis*, visto que apenas esta última subespécie tem essa capacidade. Assim, no sentido de esclarecer se alguma estirpe da

coleção do presente estudo, identificada por PCR como *S. constellatus* subsp. *pharyngis*, pertence à subespécie *viborgensis*, terá de ser testada esta reação.

Por PCR foi testado o comportamento da estirpe tipo e verificou-se que a amplificação era igual à obtida pelas estirpes de *S. constellatus* subsp. *pharyngis*, não sendo possível diferenciar estas duas subespécies. Para excluir amplificação inespecífica foi feito o teste independente com os iniciadores para a hialuronidase bifuncional e monofuncional. Os resultados sugeriram que este *taxon* apresenta capacidade de degradação de hialuronidase, tal como descrito por Jensen *et al.* e esta é provavelmente bifuncional (64). No entanto, para confirmar esta afirmação seria necessário tanto a sequenciação do produto amplificado, como a realização de testes de função, diferentes dos realizados por Smith & Willett (com os quais não obtivemos resultados (43)), tais como ensaios fluorimétricos realizados pelo ensaio de Morgan-Elson (107).

Por fim quanto às técnicas de sequenciação, no ramo de *S. constellatus* do dendrograma de MLSA, destacam-se dois núcleos coesos, o primeiro constituído pelas estirpes de *S. constellatus* subsp. *pharyngis* do presente estudo e pelas estirpes de *S. constellatus* subsp. *viborgensis* de Jensen *et al.*, que agrupam em conjunto, e o segundo pelas estirpes de *S. constellatus* subsp. *pharyngis* de Jensen *et al.* O facto de as estirpes de *S. constellatus* subsp. *pharyngis* do presente estudo agruparem com as de *S. constellatus* subsp. *viborgensis* Jensen *et al.* é possível dado que estas estirpes podem ser negativas para o ONPG. Através do PCR, análise fenotípica, concordância de nichos ecológicos e da proximidade das subespécies, até à data de descrição da subespécie *viborgensis* as estirpes eram classificadas como subespécie *pharyngis*. Embora estes grupos sejam sustentados por bons valores de “bootstrap”, a heterogeneidade presente na espécie *constellatus* deixa dúvidas quanto à definição destas subespécies. Este fenómeno destaca-se aqui devido à maior diversidade de estirpes, visto que foi incluída a coleção publicada por Jensen *et al.* (64) e a coleção invasiva do presente estudo. O ST122 embora mais distanciado encontra-se no mesmo ramo que as estirpes de *S. constellatus* subsp. *pharyngis*. Este ST demonstra o que parece ter sido recombinação no gene *ppac* com *S. anginosus* subsp. *anginosus*, sendo o único ST que não agrupa neste gene com o grupo de *S. constellatus* subsp. *constellatus* (alelo 63). A distinção de *S. constellatus* subsp. *pharyngis* e *S. constellatus* subsp. *viborgensis* fica também comprometida pelo ST93 e ST128 de *S. constellatus* subsp. *constellatus* que, à semelhança do ST122, não

se destacaram no PFGE. O gene que parece estar a causar este distanciamento do núcleo coeso de *S. constellatus* subsp. *constellatus* é o gene *sodA* no qual o alelo 45 é único para estes dois STs e tem apenas 4 pb de distância para *S. anginosus* subsp. *anginosus* enquanto 32pb diferenciam-no do alelo mais próximo do próprio *taxon*. Assim, se a localização tão afastada destes STs de *S. constellatus* subsp. *constellatus*, depender simplesmente de recombinação com estirpes de *S. anginosus* subsp. *anginosus*, não põe em causa a definição de *S. constellatus* subsp. *pharyngis* ou *S. constellatus* subsp. *viborgensis*. No entanto, a própria distinção destas subespécies é em si dúbia pelos testes realizados. No diagrama de MLST, embora com uma separação não tão clara, também se observam estes dois núcleos. Estirpes de *S. constellatus* subsp. *viborgensis* são SLV e DLV entre elas o que comprova a sua homogeneidade mas estão também ligadas por DLV às estirpes de *S. constellatus* subsp. *pharyngis* de Jensen *et al.* Em função do perfil alélico de cada gene, observam-se dois resultados distintos: nos genes *ppac* e *sodA* seguiram o modelo das sequências concatenadas, ou seja, as estirpes de *S. constellatus* subsp. *viborgensis* de Jensen *et al.* e as estirpes de *S. constellatus* subsp. *pharyngis* da coleção invasiva do presente estudo apresentaram o mesmo alelo ou muito próximo e distintos dos alelos de *S. constellatus* subsp. *pharyngis* de Jensen *et al.*, sendo estes os alelos ideais para distinção entre as subespécies. No caso de *map*, *pfl*, *tuf*, *pyk* e *rpoB* as duas subespécies apresentaram partilha de alelos, sem uma demarcação clara. Assim, apesar de ser possível a otimização de um método molecular tendo por base um ou os dois genes referidos, a definição de uma unidade taxonómica tem como objetivo não só clarificar a taxonomia como também distinguir grupos que estejam adaptados a nichos ecológicos distintos, que tenham fatores de virulência distintos ou perfis de suscetibilidade diferentes, que possam interferir com a identificação microbiológica e possam requerer tratamento específico em função destas características. Neste caso, a subespécie *viborgensis* é claramente homogénea quer fenotípica quer genotipicamente visto que todas as estirpes são  $\beta$ -hemolíticas, apresentam grupo C de Lancefield e, segundo o PCR, hialuronidase bifuncional. Estão também adaptadas a um nicho ecológico específico, a orofaringe onde causam por vezes infeção (64). No entanto, estas características são em tudo iguais às descritas para *S. constellatus* subsp. *pharyngis* com a única diferença da cisão do ONPG. No dendrograma de MLSA observa-se a formação de dois grupos independentes. Se por um lado a definição desta subespécie



levanta a questão defendida por Jensen *et al.*, se é factível e com significado biológico definir os limites de uma espécie tendo em conta apenas limites particulares de similaridade entre sequências (65), por outro a distância entre estes dois núcleos não é superior à distância genética entre estirpes de *S. constellatus* subsp. *constellatus*, que apesar de mais heterogêneas, formam o mesmo *taxon*.

Deste modo, apesar dos dados presentes neste estudo e de Jensen *et al.* que por MLSA poderiam sugerir uma separação em subespécies, não nos parece que existam dados fenotípicos nem uma ecologia distinta que justifique a distinção destas duas subespécies. Ainda assim, tendo em conta todas as características descritas por Whiley *et al.* (124) para a descrição da subespécie *pharyngis* de *S. constellatus*, esta parece de facto ser uma subespécie distinta de *S. constellatus* subsp. *constellatus* que deve no entanto incluir as estirpes descritas como *S. constellatus* subsp. *viborgensis* como incluiu até 2013.

As estirpes da linhagem *S. anginosus* *genomosubspecies* *AJI* destacada também por Jensen *et al.* (64), não mostraram qualquer padrão que as diferenciasses de *S. anginosus* subsp. *anginosus*, em nenhuma das metodologias de análise de MLSA.

A análise de perfis alélicos, tal como utilizada na técnica de MLST para outras bactérias do género *Streptococcus*, caracteriza os clones por STs únicos, tornando-se mais prática que a análise das sequências concatenadas por MLSA, na medida em que permite comparação direta quer alélica quer pelo ST, com estirpes de outras coleções. Esta permite ainda inferir relações de ancestralidade, dado que foi tido em conta um modelo evolutivo na construção das regras do algoritmo de goeBURST. No entanto, esta análise deve ser restrita a estirpes do mesmo *taxon*. Quando aplicado a SAG na sua totalidade, o algoritmo goeBURST é ainda prejudicado pela grande heterogeneidade presente na maioria dos alelos utilizados e também pelo baixo número de estirpes ainda disponíveis para comparação. Estes dois fatores impedem que por vezes a aplicação do critério da ancestralidade presente no algoritmo, seja utilizado a favor da apresentação do diagrama com relação genética mais provável e a distinção das subespécies não é ainda clara. Pelas mesmas razões, ao contrário de outros *Streptococcus*, a diversidade intra-*taxon* presente poderá comprometer a utilidade do MLST enquanto método de tipagem. No entanto, estas falhas serão colmatadas com a análise de mais estirpes que permitirão de futuro uma mais fidedigna análise, identificação taxonómica e tipagem das estirpes de

SAG. A análise por dendrograma de MLSA com as sequências concatenadas apoia a identificação por PCR.

#### 4.4 PFGE

Como já foi referido o grupo SAG apresenta uma grande diversidade fenotípica inter-espécies e intra-espécie. Contudo era importante verificar a diversidade genética presente neste grupo, a possível clonalidade das estirpes e testar se a amostra em estudo era representativa da população do grupo SAG existente. Por outro lado esperava-se com a técnica de PFGE encontrar um valor de corte que diferenciase os *taxa*.

Ao contrário de Asmah *et al.* (2009), todas as estirpes foram tipáveis, apresentando cada perfil mais de seis bandas (4). Ainda assim, a possível divisão entre os *taxa* é desde logo limitada pelo facto de *S. anginosus* subsp. *anginosus* apresentar estirpes nos dois grupos *major* aqui definidos, A e B, com apenas 32,8% de semelhança entre si. Deste modo, algumas estirpes agrupadas em A têm maior semelhança com estirpes de outros *taxa* do que com estirpes do próprio *taxon* mas do grupo B, comprovando a heterogeneidade da subespécie *anginosus*. O grupo B, bastante homogêneo, possui maioritariamente este *taxon*. Apenas uma estirpe de *S. constellatus* subsp. *constellatus* foi encontrada neste grupo com a agravante de agrupar num clone (B<sub>14</sub>) com uma estirpe de *S. anginosus* subsp. *anginosus*. Apesar de ter produzido  $\beta$ -GLU, o que seria indicativo de pertencer realmente a *S. anginosus* subsp. *anginosus*, a identificação desta estirpe por PCR foi confirmada, e é apoiada quer por MLSA quer pelos métodos fenotípicos que apontam para que pertença realmente a *S. constellatus* subsp. *constellatus*. No entanto, este grau de semelhança, dada a heterogeneidade geral do teste, permanece por explicar.

Tanto por testes de reassociação de DNA, como pelos fatores de virulência que possui e locais que infeta, *S. intermedius* é referido como sendo a espécie mais diferente do grupo (27, 121). No entanto, estudos baseados na sequenciação de *rRNA 16S* (22) e PFGE afirmam que *S. intermedius* é mais próximo geneticamente de *S. constellatus* do que qualquer uma das duas espécies a *S. anginosus* (10). Apesar de no presente estudo a demarcação não ser tão clara, o grupo B constituído por estirpes de *S. anginosus* é o primeiro que se diferencia confirmando este distanciamento. Não obstante, o grupo A inclui ainda estirpes de *S. anginosus* e o grupo II de *S. intermedius* agrupa mais proximamente com estas. *S. constellatus* apresentou maior coerência que *S. anginosus* e que *S. intermedius*, sendo a subespécie *S. constellatus* subsp. *pharyngis*, o *taxon* mais

clonal, com elevados níveis de semelhança entre estirpes da subespécie. O facto de a subespécie ser descrita pela sua homogeneidade fenotípica, muito superior à subespécie *constellatus*, comprova-se geneticamente por PFGE. Contudo, pela mesma razão, *S. anginosus* subsp. *whileyi* deveria estar na mesma situação, o que não se verificou.

O estudo pelo AW dos grupos formados a diversos valores de corte permitiu avaliar qual seria o melhor valor a assumir para o estudo de SAG. Interessava-nos por isso um equilíbrio que permitisse uma boa discriminação mas também um bom poder preditivo, que quando analisadas duas estirpes e estas pertencessem ao mesmo clone, se pudesse assumir com alguma certeza, que pertenciam ao mesmo *taxon*. O valor assumido, 61%, apresenta vários clones dispersos e muitos deles são constituídos apenas por uma espécie ou subespécie, mas tem também clones que englobam já vários *taxa*. Assim, aumentando o valor de corte, apesar de aumentar a capacidade de discriminação e separar as estirpes de *taxa* diferentes que a 61% ficam no mesmo clone, iria ser perdido algum do poder preditivo, pois apesar de ser mais precisa a semelhança, as estirpes ficariam mais separadas, o que não permitiria tirar conclusões quanto a pertencerem ao mesmo *taxon*. Por outro lado, diminuindo este valor, iriam formar-se mais clones mas com mais diversidade de espécies e subespécies, diminuindo também o valor preditivo.

Foi possível concluir que a amostra em estudo era de facto representativa da população embora tivesse favorecido o estudo a presença de mais estirpes dos *taxa* menos presentes (*S. intermedius*, *S. anginosus* subsp. *whileyi* e *S. constellatus* subsp. *pharyngis*). Tal como descrito (10), o método apresenta um bom poder discriminatório, visto que no presente estudo apenas duas estirpes apresentaram o mesmo perfil. De acordo com estudos anteriores (10, 64) e com as técnicas moleculares já analisadas, a população em estudo é geneticamente bastante diversa e por isso muito pouco clonal. O corte a 61% de semelhança é ainda algo impreciso, pois leva à formação de clones com vários *taxa*, discordando do estudo de Bartie *et al.*, onde com cortes com um mínimo de 47% de semelhança se definiu grupos coesos entre as espécies apenas com duas estirpes discordantes (2,3%) (10).

Esta técnica não pode constituir uma forma de identificação ou de discriminação entre as espécies ou subespécies. Estes resultados seriam já esperados visto que o PFGE engloba a digestão do DNA total por uma enzima. Grandes diferenças no perfil podem ser provocadas assim que há mudança de uma região de corte, independentemente de

ser um gene diverso ou conservado (“housekeeping”) entre as espécies. Igualmente, a aquisição e perda de DNA ao longo dos anos num *taxon*, pode levar a que o perfil se aproxime mais do de outra espécie, sugerindo uma alta taxa de recombinação em SAG (10). Esta técnica com elevado poder discriminatório, é por isso usada para tipagem, distinguindo clones da mesma espécie dentro de surtos num reduzido espaço físico e temporal. As estirpes aqui presentes pertenciam a espécies diferentes, eram recolhidas de diversos hospitais em várias zonas do país, num período de 12 anos, o que diminuía a probabilidade de se verificar alguma clonalidade tal como descrito (4). Ainda assim, apesar de todos estes fatores, nenhum dos estudos anteriores, em que também se compararam em simultâneo estirpes dos vários *taxa* de SAG, reportou uma diversidade tão extensa, permanecendo por explicar a diversidade do presente estudo (4, 10).

#### 4.5 Antimicrobianos

Devido ao aumento da resistência aos antimicrobianos registado nos últimos anos no grupo *viridans* e outros *Streptococcus*, a monitorização da resistência em SAG torna-se fundamental. Ainda assim, um estudo realizado nos EUA, com estirpes deste grupo recolhidas ao longo de mais de duas décadas, afirmou que não havia tendência para que as estirpes mais recentes apresentassem níveis superiores de resistência (112).

No que respeita aos  $\beta$ -lactâmicos, foi descrita ausência de resistência para a penicilina, tal como no presente estudo (4, 7, 30, 39, 44, 51, 61, 76, 112, 113). No entanto, foi já sugerido que algumas estirpes apresentam valores de MIC que apesar de se encontrarem dentro da suscetibilidade são já bastante elevados, ou estirpes com resistência intermédia (4, 76, 112). *S. intermedius* foi a espécie mais resistente e *S. constellatus* a espécie com menor resistência, de acordo com Bantar *et al.* e Tracy *et al.* (8, 112). Pelo contrário, Limia *et al.* refere que resistência ainda que em níveis intermédios foi bastante prevalente em *S. constellatus* (76). No presente estudo não foram encontradas resistências à ceftriaxona de acordo com o literatura mais recente (4, 7, 112), no entanto 1,69% das estirpes de *S. anginosus* subsp. *anginosus* apresentaram resistência para a cefotaxima, também uma cefalosporina. Sendo o imipenemo o  $\beta$ -lactâmico mais ativo de entre os testados, o resultado para a estirpe de *S. intermedius* que apresentou perfil de não-suscetibilidade, sem resistência à penicilina, deve ser confirmado por E-test.

Apenas uma estirpe de *S. anginosus* subsp. *anginosus* apresentou resistência à levofloxacina e os halos observados nas restantes não eram próximos do limiar para a

resistência. Estes resultados são discordantes das afirmações sucessivas de que a resistência às fluoroquinolonas pode estar a aumentar (4, 76). No entanto estes estudos propuseram o aumento da resistência com base nos testes realizados com ciprofloxacina, uma fluoroquinolona de segunda geração, em vez da terceira geração a que pertence a levofloxacina, e que tem nos estreptococos menor atividade que a levofloxacina.

De acordo com o publicado, o clorafenicol apresentou também níveis de resistência próximos de zero com apenas duas estirpes resistentes (7, 30, 39). O cotrimoxazole, com níveis de resistência um pouco superiores apresentou três estirpes resistentes de *S. anginosus* subsp. *anginosus* e uma de cada subespécie de *S. constellatus*. Este antimicrobiano é o que apresenta resultados mais variáveis segundo os estudos anteriores com níveis de resistência de 0 a 50,7% (7, 30, 39, 76). Na origem destas discrepâncias pode estar a população bacteriana estudada pois julga-se que a pressão imposta pelo consumo de antibióticos será o principal fator desencadeante de resistência (16, 67, 78). Como tal os níveis de resistência podem variar de país para país consoante o nível de consumo, tal como sugerido para a ciprofloxacina, azitromicina e penicilina.

Não foram registadas resistências aos aminoglicosídeos (estreptomina e gentamicina) de acordo com Bantar *et al.*, embora tenha já sido descrita resistência de baixo nível (51, 76). A vancomicina, linezolid e quinupristina-dalfopristina mostraram excelentes perfis de suscetibilidade não tendo sido encontradas resistências (4, 7, 8, 39, 61, 76, 113).

A eritromicina e clindamicina foram dos antibióticos com níveis mais elevados de resistência 10,33% e 9,86% respetivamente, resistências mais baixas que as observadas em Espanha, e no Canadá mas mais elevadas do que as observadas na Alemanha (4, 44, 76). A proporção de estirpes resistentes aos dois antimicrobianos foi semelhante em *S. anginosus* subsp. *anginosus* e *S. constellatus* subsp. *constellatus*. De acordo com Grinwish *et al.* e Limia *et al.* também foi encontrada resistência em *S. intermedius* e, de acordo com o primeiro autor, foi de todos, o *taxon* com maior taxa de resistência (44, 76). No entanto, no nosso estudo esta foi representada apenas por uma estirpe. A análise de mais estirpes será necessária para confirmar esta tendência. Todas as estirpes com resistência à clindamicina eram também resistentes à eritromicina com fenótipo cMLS<sub>B</sub> (9,86%). Uma estirpe de *S. anginosus* subsp. *anginosus* apresentou fenótipo iMLS<sub>B</sub>, que indica a resistência à clindamicina apenas através da indução pela eritromicina. Por esta razão, a resistência à clindamicina deve ser assumida como 10,3%. Nenhuma das

estirpes foi resistente apenas à eritromicina (fenótipo M). No sentido de monitorizar a presença de genes de resistência, seria importante rastrear quais os genes responsáveis pela resistência observada, à semelhança do realizado noutros estudos (4, 23, 63).

A tetraciclina é consensualmente o antibiótico onde são descritos níveis superiores de resistência, encontrando-se nas três espécies, mas em maior número em *S. anginosus* (7, 39, 51, 61, 76). No presente estudo, cerca de 22% das estirpes apresentaram perfil de resistência ou resistência intermédia à tetraciclina, sendo *S. constellatus* subsp. *pharyngis* e *S. anginosus* subsp. *anginosus* os taxa com níveis superiores, 37,5% e 30,5% respetivamente. Sendo que nenhum dos estudos anteriores distinguiu as subespécies de *S. constellatus*, os níveis altos de resistência para a subespécie *pharyngis* são aqui encontrados pela primeira vez. Dado que esta é a subespécie menos prevalente na infeção, estes resultados eram provavelmente ocultados pelo conjunto de *S. constellatus*, ilustrado pela resistência de apenas 11% das estirpes desta espécie neste estudo. *S. intermedius* (n=7) apresentou apenas uma estirpe com resistência para este antimicrobiano, sendo a mesma onde se observou fenótipo cMLS<sub>B</sub>. Um estudo da prevalência dos genes de resistência, já descritos para a tetraciclina é necessário (23). No total 7% das estirpes apresentaram resistência a estes três antimicrobianos, constituindo casos de multirresistência. Apenas um outro caso de multirresistência foi observado numa estirpe, com resistência conjunta a tetraciclina, clorafenicol e cefotaxima.

Apesar da maioria dos estudos que monitorizaram a suscetibilidade aos antimicrobianos terem sido realizados na década de 90, implicando por isso diferenças nas normas em vigor para a definição de resistência, assim como no método de identificação, a afirmação de que SAG são na maioria suscetíveis aos antimicrobianos estudados, mantém-se atual (61, 76). A penicilina, antimicrobiano de escolha no tratamento deste grupo, pode assim continuar a ser administrada, pelo menos no que respeita a Portugal tal como já tinha sido observado na Alemanha (4). Embora tenham já sido registados baixos níveis de resistência, estes não estão a acompanhar os registados para o grupo *viridans*. No entanto a escolha de macrólidos enquanto alternativa a este tratamento deve ser cuidadosamente analisada dado que o nível de estirpes resistentes é já considerável. A elevada frequência de troca genética entre espécies do género *Streptococcus* e o aumento da resistência no grupo *viridans*, também parte da microbiota poderão vir a contribuir para um aumento da resistência em SAG (4, 61).

#### 4.6 Conclusões

O trabalho apresentado confirma a heterogeneidade de SAG, particularmente presente em *S. anginosus* subsp. *anginosus* e *S. constellatus* subsp. *constellatus*. *S. intermedius* é a espécie mais associada à infecção invasiva, realçando a importância da identificação ao nível da espécie e subespécie. Também entre os grupos etários se observaram diferenças na invasibilidade da infecção. É importante estudar a associação entre *taxa* e diferentes focos de infecção dado que os estudos existentes precedem a taxonomia atual. É ainda imprescindível o estudo aprofundado dos fatores de virulência, com vista ao esclarecimento dos mecanismos de patogenicidade deste grupo, que apresenta uma considerável morbidade e mortalidade (6, 8, 35, 54). A identificação fenotípica é afetada pela variabilidade do grupo e depende por vezes das condições de incubação e inóculo. Não deve por isso ser utilizada como método de identificação de rotina ou de referência como tem sido hábito, devendo optar-se pelo MALDI-TOF. Este método mostrou ser o mais congruente na identificação de SAG mas necessita de um aumento na base de dados para poder ser utilizado com confiança, na identificação de rotina deste grupo. Se possível o método de referência para o grupo deve ser alterado para o PCR que mostrou a robustez, sensibilidade e reprodutibilidade necessárias, em oposição ao atual método de referência por perfil enzimático que está bastante desatualizado e sujeito aos problemas inerentes a qualquer identificação enzimática. O PCR mostrou também concordância com os métodos de sequenciação que ajudaram a esclarecer a taxonomia e que, em caso de dúvida devem ser utilizados na identificação. *S. anginosus* subsp. *whileyi* deve ser melhor caracterizado, com um número maior de estirpes, e a definição de *S. constellatus* subsp. *viborgensis* deve ser reanalisada. Assim, à luz do presente estudo, o grupo é constituído por cinco *taxa*: *S. anginosus* subsp. *anginosus*, *S. anginosus* subsp. *whileyi*, *S. constellatus* subsp. *constellatus*, *S. constellatus* subsp. *pharyngis* e *S. intermedius*, taxonomia apoiada por tipagem molecular (MLSA). Estes *taxa* podem ser distinguidos por PCR e pensamos que num futuro próximo por MALDI-TOF, método facilmente implementável na rotina da microbiologia clínica. No presente trabalho foram aplicados os genes utilizados em MLSA para uma análise de perfis alélicos igual à aplicada em MLST, por goeBURST MST, que facilitará a tipagem molecular intra-*taxon* e comparação entre estudos, permitindo desenvolver o conhecimento acerca dos estreptococos do grupo *anginosus*.

### 5. Referências bibliográficas

---

1. **Ahmet, Z., M. Warren, and E. Houang.** 1995. Species identification of members of the *Streptococcus milleri* group isolated from the vagina by ID 32 Strep system and differential phenotypic characteristics. *J Clin Microbiol* **33**:1592-5.
2. **Appelbaum, P. C.** 2002. Resistance among *Streptococcus pneumoniae*: Implications for drug selection. *Clin Infect Dis* **34**:1613-20.
3. **Asam, D., S. Maurer, E. Walheim, and B. Spellerberg.** 2013. Identification of beta-haemolysin-encoding genes in *Streptococcus anginosus*. *Mol Oral Microbiol*.
4. **Asmah, N., B. Eberspacher, T. Regnath, and M. Arvand.** 2009. Prevalence of erythromycin and clindamycin resistance among clinical isolates of the *Streptococcus anginosus* group in Germany. *J Med Microbiol* **58**:222-7.
5. **Ball, L. C., and M. T. Parker.** 1979. The cultural and biochemical characters of *Streptococcus milleri* strains isolated from human sources. *J Hyg (Lond)* **82**:63-78.
6. **Bancescu, G., S. Dumitriu, A. Bancescu, and N. Skaug.** 1999. Streptococci species of *anginosus* group isolated from oral and maxillofacial infections. *Roum Arch Microbiol Immunol* **58**:49-55.
7. **Bancescu, G., N. Skaug, S. Dumitriu, and A. Bancescu.** 1999. Antimicrobial susceptibility of some streptococci strains of *anginosus* group isolated from oral and maxillofacial infections. *Roum Arch Microbiol Immunol* **58**:57-63.
8. **Bantar, C., L. Fernandez Canigia, S. Relloso, A. Lanza, H. Bianchini, and J. Smayevsky.** 1996. Species belonging to the "*Streptococcus milleri*" group: antimicrobial susceptibility and comparative prevalence in significant clinical specimens. *J Clin Microbiol* **34**:2020-2.
9. **Barry, A. L., and K. L. Feeney.** 1967. Two quick methods for Voges-Proskauer test. *Appl Microbiol* **15**:1138-41.
10. **Bartie, K. L., M. J. Wilson, D. W. Williams, and M. A. Lewis.** 2000. Macrorestriction fingerprinting of "*Streptococcus milleri*" group bacteria by pulsed-field gel electrophoresis. *J Clin Microbiol* **38**:2141-9.
11. **Beighton, D., and R. A. Whaley.** 1990. Sialidase activity of the "*Streptococcus milleri* group" and other *viridans* group streptococci. *J Clin Microbiol* **28**:1431-3.
12. **Benjamini, Y., D. Drai, G. Elmer, N. Kafkafi, and I. Golani.** 2001. Controlling the false discovery rate in behavior genetics research. *Behav Brain Res* **125**:279-84.
13. **Bentley, R. W., J. A. Leigh, and M. D. Collins.** 1991. Intrageneric structure of



- Streptococcus* based on comparative analysis of small-subunit rRNA sequences. Int J Syst Bacteriol **41**:487-94.
14. **Bishop, C. J., D. M. Aanensen, G. Jordan, M. Kilian, W. P. Hanage, and B. G. Spratt.** 2009. Assigning strains to bacterial species via the internet. BMC Biol **7**:3.
  15. **Brook, I., and E. H. Frazier.** 1994. Microaerophilic streptococci as a significant pathogen: a twelve-year review. J Med **25**:129-44.
  16. **Carratala, J., F. Alcaide, A. Fernandez-Sevilla, X. Corbella, J. Linares, and F. Gudiol.** 1995. Bacteremia due to *viridans* streptococci that are highly resistant to penicillin: increase among neutropenic patients with cancer. Clin Infect Dis **20**:1169-73.
  17. **Carrico, J. A., F. R. Pinto, C. Simas, S. Nunes, N. G. Sousa, N. Frazao, H. de Lencastre, and J. S. Almeida.** 2005. Assessment of band-based similarity coefficients for automatic type and subtype classification of microbial isolates analyzed by pulsed-field gel electrophoresis. J Clin Microbiol **43**:5483-90.
  18. **Carrico, J. A., C. Silva-Costa, J. Melo-Cristino, F. R. Pinto, H. de Lencastre, J. S. Almeida, and M. Ramirez.** 2006. Illustration of a common framework for relating multiple typing methods by application to macrolide-resistant *Streptococcus pyogenes*. J Clin Microbiol **44**:2524-32.
  19. **Casariello, E., A. Rodriguez, J. C. Corredoira, P. Alonso, A. Coira, M. Bal, M. J. Lopez, and J. Varela.** 1996. Prospective study of *Streptococcus milleri* bacteremia. Eur J Clin Microbiol Infect Dis **15**:194-200.
  20. **Cellucci, M., E. Simon, and S. Eppes.** 2012. Microbiology and management of pediatric liver abscesses: two cases caused by *Streptococcus anginosus* group. Case Rep Infect Dis **2012**:685953.
  21. **Claridge, J. E., 3rd, S. Attorri, D. M. Musher, J. Hebert, and S. Dunbar.** 2001. *Streptococcus intermedius*, *Streptococcus constellatus*, and *Streptococcus anginosus* ("*Streptococcus milleri* group") are of different clinical importance and are not equally associated with abscess. Clin Infect Dis **32**:1511-5.
  22. **Clarridge, J. E., 3rd, C. Osting, M. Jalali, J. Osborne, and M. Waddington.** 1999. Genotypic and phenotypic characterization of "*Streptococcus milleri*" group isolates from a veterans administration hospital population. J Clin Microbiol **37**:3681-7.
  23. **Clermont, D., and T. Horaud.** 1990. Identification of chromosomal antibiotic

- resistance genes in *Streptococcus anginosus* ("*S. milleri*"). *Antimicrob Agents Chemother* **34**:1685-90.
24. **Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).** 2013. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-third information supplement. CLSI document M100-S23, Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, USA.
  25. **Colman, G., and R. E. Williams.** 1965. The cell walls of streptococci. *J Gen Microbiol* **41**:375-87.
  26. **Corredoira, J., E. Casariego, C. Moreno, L. Villanueva, M. J. L. Alvarez, J. Varela, A. Rodriguez, P. Alonso, and A. Coira.** 1998. Prospective study of *Streptococcus milleri* hepatic abscess. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **17**:556-560.
  27. **Coykendall, A. L.** 1989. Classification and identification of the *viridans* streptococci. *Clin Microbiol Rev* **2**:315-28.
  28. **Coykendall, A. L., P. M. Wesbecher, and K. B. Gustafson.** 1987. *Streptococcus milleri*, *Streptococcus constellatus*, and *Streptococcus intermedius* are later synonyms of *Streptococcus anginosus*. *Int J Syst Bacteriol* **37**:222-228.
  29. **Doern, C. D., and C. A. Burnham.** 2010. It's not easy being green: the *viridans* group streptococci, with a focus on pediatric clinical manifestations. *J Clin Microbiol* **48**:3829-35.
  30. **Doern, G. V., M. J. Ferraro, A. B. Brueggemann, and K. L. Ruoff.** 1996. Emergence of high rates of antimicrobial resistance among *viridans* group streptococci in the United States. *Antimicrob Agents Chemother* **40**:891-4.
  31. **Drancourt, M., V. Roux, P. E. Fournier, and D. Raoult.** 2004. *rpoB* gene sequence-based identification of aerobic Gram-positive cocci of the genera *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Gemella*, *Abiotrophia*, and *Granulicatella*. *J Clin Microbiol* **42**:497-504.
  32. **European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST).** 2012. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. 11.1 ed.
  33. **Facklam, R.** 2002. What happened to the streptococci: Overview of taxonomic and nomenclature changes. *Clin Microbiol Rev* **15**:613-30.
  34. **Feil, E. J., B. C. Li, D. M. Aanensen, W. P. Hanage, and B. G. Spratt.** 2004. eBURST: inferring patterns of evolutionary descent among clusters of related bacterial genotypes from multilocus sequence typing data. *J Bacteriol* **186**:1518-30.
  35. **Flynn, C. E., and K. L. Ruoff.** 1995. Identification of "*Streptococcus milleri*"

- group isolates to the species level with a commercially available rapid test system. J Clin Microbiol **33**:2704-6.
36. **Friedrichs, C., A. C. Rodloff, G. S. Chhatwal, W. Schellenberger, and K. Eschrich.** 2007. Rapid identification of *viridans* streptococci by mass spectrometric discrimination. J Clin Microbiol **45**:2392-7.
37. **Glazunova, O. O., D. Raoult, and V. Roux.** 2010. Partial *recN* gene sequencing: a new tool for identification and phylogeny within the genus *Streptococcus*. Int J Syst Evol Microbiol **60**:2140-8.
38. **Glazunova, O. O., D. Raoult, and V. Roux.** 2009. Partial sequence comparison of the *rpoB*, *sodA*, *groEL* and *gyrB* genes within the genus *Streptococcus*. Int J Syst Evol Microbiol **59**:2317-22.
39. **Gomez-Garces, J. L., J. I. Alos, and R. Cogollos.** 1994. Bacteriologic characteristics and antimicrobial susceptibility of 70 clinically significant isolates of *Streptococcus milleri* group. Diagn Microbiol Infect Dis **19**:69-73.
40. **Gordillo, M. E., K. V. Singh, C. J. Baker, and B. E. Murray.** 1993. Typing of group B streptococci: comparison of pulsed-field gel electrophoresis and conventional electrophoresis. J Clin Microbiol **31**:1430-4.
41. **Gossling, J.** 1988. Occurrence and pathogenicity of the *Streptococcus milleri* group. Rev Infect Dis **10**:257-85.
42. **Goto, T., H. Nagamune, A. Miyazaki, Y. Kawamura, O. Ohnishi, K. Hattori, K. Ohkura, K. Miyamoto, S. Akimoto, T. Ezaki, K. Hirota, Y. Miyake, T. Maeda, and H. Kourai.** 2002. Rapid identification of *Streptococcus intermedius* by PCR with the *ily* gene as a species marker gene. J Med Microbiol **51**:178-86.
43. **Grinwis, M. E., C. D. Sibley, M. D. Parkins, C. S. Eshaghurshan, H. R. Rabin, and M. G. Surette.** 2010. Characterization of *Streptococcus milleri* group isolates from expectorated sputum of adult patients with cystic fibrosis. J Clin Microbiol **48**:395-401.
44. **Grinwis, M. E., C. D. Sibley, M. D. Parkins, C. S. Eshaghurshan, H. R. Rabin, and M. G. Surette.** 2010. Macrolide and clindamycin resistance in *Streptococcus milleri* group isolates from the airways of cystic fibrosis patients. Antimicrob Agents Chemother **54**:2823-9.
45. **Guthof, O.** 1956. [Pathogenic strains of *Streptococcus viridans*; streptococci found in dental abscesses and infiltrates in the region of the oral cavity]. Zentralbl Bakteriol Orig **166**:553-64.

46. **Hakenbeck, R., A. König, I. Kern, M. van der Linden, W. Keck, D. Billot-Klein, R. Legrand, B. Schoot, and L. Gutmann.** 1998. Acquisition of five high-Mr penicillin-binding protein variants during transfer of high-level beta-lactam resistance from *Streptococcus mitis* to *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol* **180**:1831-40.
47. **Han, J. K., and J. Kerschner.** 2001. *Streptococcus milleri*: an organism for head and neck infections and abscess. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* **127**:650-4.
48. **Havarstein, L. S.** 2010. Increasing competence in the genus *Streptococcus*. *Mol Microbiol* **78**:541-4.
49. **Havarstein, L. S., R. Hakenbeck, and P. Gaustad.** 1997. Natural competence in the genus *Streptococcus*: evidence that streptococci can change phenotype by interspecies recombinational exchanges. *J Bacteriol* **179**:6589-94.
50. **Homer, K. A., L. Denbow, R. A. Whiley, and D. Beighton.** 1993. Chondroitin sulfate depolymerase and hyaluronidase activities of *viridans* streptococci determined by a sensitive spectrophotometric assay. *J Clin Microbiol* **31**:1648-51.
51. **Horton, W. A., D. B. Drucker, A. E. Jacob, and V. F. Hillier.** 1992. Susceptibility of sixty-five non-oral clinical isolates of the *Streptococcus milleri* group to seven antimicrobial agents. *Microbios* **71**:125-34.
52. **Hoshino, T., T. Fujiwara, and M. Kilian.** 2005. Use of phylogenetic and phenotypic analyses to identify nonhemolytic streptococci isolated from bacteremic patients. *J Clin Microbiol* **43**:6073-85.
53. **Hynes, W. L., and S. L. Walton.** 2000. Hyaluronidases of Gram-positive bacteria. *FEMS Microbiol Lett* **183**:201-7.
54. **Jacobs, J. A., H. G. Pietersen, E. E. Stobberingh, and P. B. Soeters.** 1994. Bacteremia involving the *Streptococcus milleri* Group - Analysis of 19 Cases. *Clinical Infectious Diseases* **19**:704-713.
55. **Jacobs, J. A., H. G. Pietersen, E. E. Stobberingh, and P. B. Soeters.** 1995. *Streptococcus anginosus*, *Streptococcus constellatus* and *Streptococcus intermedius*. Clinical relevance, hemolytic and serologic characteristics. *Am J Clin Pathol* **104**:547-53.
56. **Jacobs, J. A., C. S. Schot, A. E. Bunschoten, and L. M. Schouls.** 1996. Rapid species identification of "*Streptococcus milleri*" strains by line blot hybridization: identification of a distinct *16S rRNA* population closely related to *Streptococcus constellatus*. *J Clin Microbiol* **34**:1717-21.

57. **Jacobs, J. A., C. S. Schot, and L. M. Schouls.** 2000. Haemolytic activity of the *Streptococcus milleri* group and relationship between haemolysis restricted to human red blood cells and pathogenicity in *S. intermedius*. J Med Microbiol **49**:55-62.
58. **Jacobs, J. A., C. S. Schot, and L. M. Schouls.** 2000. The *Streptococcus anginosus* species comprises five *16S rRNA* ribogroups with different phenotypic characteristics and clinical relevance. Int J Syst Evol Microbiol **50**:1073-9.
59. **Jacobs, J. A., H. C. Schouten, E. E. Stobberingh, and P. B. Soeters.** 1995. *Viridans* Streptococci isolated from the blood-stream - Relevance of species identification. Diagn Micr Infec Dis **22**:267-273.
60. **Jacobs, J. A., and E. E. Stobberingh.** 1995. Hydrolytic enzymes of *Streptococcus anginosus*, *Streptococcus constellatus* and *Streptococcus intermedius* in relation to infection. Eur J Clin Microbiol Infect Dis **14**:818-820.
61. **Jacobs, J. A., and E. E. Stobberingh.** 1996. In-vitro antimicrobial susceptibility of the "*Streptococcus milleri*" group (*Streptococcus anginosus*, *Streptococcus constellatus* and *Streptococcus intermedius*). J Antimicrob Chemother **37**:371-5.
62. **Jacobs, J. A., J. H. Tjhie, M. G. Smeets, C. S. Schot, and L. M. Schouls.** 2003. Genotyping by amplified fragment length polymorphism analysis reveals persistence and recurrence of infection with *Streptococcus anginosus* group organisms. J Clin Microbiol **41**:2862-6.
63. **Jacobs, J. A., G. J. van Baar, N. H. London, J. H. Tjhie, L. M. Schouls, and E. E. Stobberingh.** 2001. Prevalence of macrolide resistance genes in clinical isolates of the *Streptococcus anginosus* ("*S. milleri*") group. Antimicrob Agents Chemother **45**:2375-7.
64. **Jensen, A., T. Hoshino, and M. Kilian.** 2013. Taxonomy of the *anginosus* group of the genus *Streptococcus* and description of *Streptococcus anginosus* subsp. *whileyi* subsp. nov. and *Streptococcus constellatus* subsp. *viborgensis* subsp. nov. Int J Syst Evol Microbiol **63**:2506-19.
65. **Jensen, A., and M. Kilian.** 2012. Delineation of *Streptococcus dysgalactiae*, its subspecies, and its clinical and phylogenetic relationship to *Streptococcus pyogenes*. J Clin Microbiol **50**:113-26.
66. **Jouhadi, Z., H. Sadiki, I. Hafid, and J. Najib.** 2013. [*Streptococcus intermedius*: a rare cause of brain abscess in children]. Arch Pediatr **20**:282-5.
67. **Kastner, U., and J. P. Guggenbichler.** 2001. Influence of macrolide antibiotics on

- promotion of resistance in the oral flora of children. *Infection* **29**:251-6.
68. **Kawamura, Y., X. G. Hou, F. Sultana, H. Miura, and T. Ezaki.** 1995. Determination of *16S rRNA* sequences of *Streptococcus mitis* and *Streptococcus gordonii* and phylogenetic relationships among members of the genus *Streptococcus*. *Int J Syst Bacteriol* **45**:406-8.
69. **Knight, R. G., and D. M. Shlaes.** 1988. Physiological characteristics and deoxyribonucleic acid relatedness of *Streptococcus intermedius* strains. *Int J Syst Bacteriol* **38**:19-24.
70. **LaChapelle, S., R. K. Tweten, and E. M. Hotze.** 2009. Intermedilysin-receptor interactions during assembly of the pore Complex. *J Biol Chem* **284**:12719-12726.
71. **Lal, D., M. Verma, and R. Lal.** 2011. Exploring internal features of *16S rRNA* gene for identification of clinically relevant species of the genus *Streptococcus*. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* **10**:28.
72. **Lancefield, R. C.** 1933. A serological differentiation of human and other groups of hemolytic Streptococci. *J Exp Med* **57**:571-95.
73. **Landrygan-Bakri, J., M. J. Wilson, D. W. Williams, M. A. Lewis, and R. J. Waddington.** 2012. Real-time monitoring of the adherence of *Streptococcus anginosus* group bacteria to extracellular matrix decorin and biglycan proteoglycans in biofilm formation. *Res Microbiol* **163**:436-47.
74. **Ledezma-Rasillo, G., H. Flores-Reyes, A. M. Gonzalez-Amaro, A. Garrocho-Rangel, M. D. Ruiz-Rodriguez, and A. J. Pozos-Guillen.** 2010. Identification of cultivable microorganisms from primary teeth with necrotic pulps. *J Clin Pediatr Dent* **34**:329-333.
75. **Limia, A., T. Alarcon, M. L. Jimenez, and M. Lopez-Brea.** 2000. Comparison of three methods for identification of *Streptococcus milleri* group isolates to species level. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **19**:128-31.
76. **Limia, A., M. L. Jimenez, T. Alarcon, and M. Lopez-Brea.** 1999. Five-year analysis of antimicrobial susceptibility of the *Streptococcus milleri* group. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **18**:440-4.
77. **Maiden, M. C., J. A. Bygraves, E. Feil, G. Morelli, J. E. Russell, R. Urwin, Q. Zhang, J. Zhou, K. Zurth, D. A. Caugant, I. M. Feavers, M. Achtman, and B. G. Spratt.** 1998. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**:3140-5.

78. **Malhotra-Kumar, S., C. Lammens, S. Coenen, K. Van Herck, and H. Goossens.** 2007. Effect of azithromycin and clarithromycin therapy on pharyngeal carriage of macrolide-resistant streptococci in healthy volunteers: a randomised, double-blind, placebo-controlled study. *Lancet* **369**:482-90.
79. **Mejare, B.** 1975. Characteristics of *Streptococcus milleri* and *Streptococcus mitior* from infected dental root canals. *Odontol Revy* **26**:291-308.
80. **Mishra, A. K., and P. E. Fournier.** 2013. The role of *Streptococcus intermedius* in brain abscess. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **32**:477-83.
81. **Molina, J. M., C. Leport, A. Bure, M. Wolff, C. Michon, and J. L. Vilde.** 1991. Clinical and bacterial features of infections caused by *Streptococcus milleri*. *Scand J Infect Dis* **23**:659-66.
82. **Moyo, S. R., J. A. Maeland, and K. Bergh.** 2002. Typing of human isolates of *Streptococcus agalactiae* (group B streptococcus, GBS) strains from Zimbabwe. *J Med Microbiol* **51**:595-600.
83. **Nagamune, H., C. Ohnishi, A. Katsuura, K. Fushitani, R. A. Whiley, A. Tsuji, and Y. Matsuda.** 1996. Intermedilysin, a novel cytotoxin specific for human cells secreted by *Streptococcus intermedius* UNS46 isolated from a human liver abscess. *Infect Immun* **64**:3093-100.
84. **Nagamune, H., R. A. Whiley, T. Goto, Y. Inai, T. Maeda, J. M. Hardie, and H. Kourai.** 2000. Distribution of the intermedilysin gene among the *anginosus* group streptococci and correlation between intermedilysin production and deep-seated infection with *Streptococcus intermedius*. *J Clin Microbiol* **38**:220-6.
85. **Nagashima, H., A. Takao, and N. Maeda.** 1999. Abscess forming ability of *Streptococcus milleri* group: synergistic effect with *Fusobacterium nucleatum*. *Microbiol Immunol* **43**:207-16.
86. **Okayama, H., E. Nagata, H. O. Ito, T. Oho, and M. Inoue.** 2005. Experimental abscess formation caused by human dental plaque. *Microbiol Immunol* **49**:399-405.
87. **Ottens, H., and K. C. Winkler.** 1962. Indifferent and haemolytic Streptococci possessing group-antigen F. *J Gen Microbiol* **28**:181-191.
88. **Parker, M. T., and L. C. Ball.** 1976. Streptococci and Aerococci associated with systemic infection in Man. *J Med Microbiol* **9**:275-302.
89. **Pecharki, D., F. C. Petersen, and A. A. Scheie.** 2008. Role of hyaluronidase in *Streptococcus intermedius* biofilm. *Microbiology* **154**:932-8.

90. **Picard, F. J., D. Ke, D. K. Boudreau, M. Boissinot, A. Huletsky, D. Richard, M. Ouellette, P. H. Roy, and M. G. Bergeron.** 2004. Use of *tuf* sequences for genus-specific PCR detection and phylogenetic analysis of 28 streptococcal species. *J Clin Microbiol* **42**:3686-95.
91. **Poole, P. M., and G. Wilson.** 1979. Occurrence and cultural features of *Streptococcus milleri* in various body sites. *J Clin Pathol* **32**:764-8.
92. **Poole, P. M., and G. Wilson.** 1977. *Streptococcus milleri* in the appendix. *J Clin Pathol* **30**:937-42.
93. **Poyart, C., G. Quesne, S. Coulon, P. Berche, and P. Trieu-Cuot.** 1998. Identification of streptococci to species level by sequencing the gene encoding the manganese-dependent superoxide dismutase. *J Clin Microbiol* **36**:41-47.
94. **Poyart, C., G. Quesne, and P. Trieu-Cuot.** 2002. Taxonomic dissection of the *Streptococcus bovis* group by analysis of manganese-dependent superoxide dismutase gene (*sodA*) sequences: reclassification of '*Streptococcus infantarius* subsp. *coli*' as *Streptococcus lutetiensis* sp. nov. and of *Streptococcus bovis* biotype II.2 as *Streptococcus pasteurianus* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* **52**:1247-55.
95. **Roa, P. L., C. S. Carrillo, M. Marin, F. Romero, E. Cercenado, and E. Bouza.** 2013. Value of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight for routine identification of *viridans* group streptococci causing bloodstream infections. *Clin Microbiol and Infec* **19**:438-444.
96. **Rodriguez-Avial, I., C. Rodriguez-Avial, E. Culebras, and J. J. Picazo.** 2005. In vitro activity of telithromycin against *viridans* group streptococci and *Streptococcus bovis* isolated from blood: antimicrobial susceptibility patterns in different groups of species. *Antimicrob Agents Chemother* **49**:820-3.
97. **Salavert, M., L. Gomez, M. Rodriguez-Carballeira, M. Xercavins, N. Freixas, and J. Garau.** 1996. Seven-year review of bacteremia caused by *Streptococcus milleri* and other *viridans* streptococci. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **15**:365-71.
98. **Serrano, I., J. Melo-Cristino, J. A. Carrico, and M. Ramirez.** 2005. Characterization of the genetic lineages responsible for pneumococcal invasive disease in Portugal. *J Clin Microbiol* **43**:1706-15.
99. **Severiano, A., F. R. Pinto, M. Ramirez, and J. A. Carrico.** 2011. Adjusted Wallace coefficient as a measure of congruence between typing methods. *J Clin Microbiol* **49**:3997-4000.



100. **Shain, H., K. A. Homer, and D. Beighton.** 1996. Degradation and utilisation of chondroitin sulphate by *Streptococcus intermedius*. J Med Microbiol **44**:372-80.
101. **Shinzato, T., and A. Saito.** 1994. A mechanism of pathogenicity of "*Streptococcus milleri* group" in pulmonary infection: synergy with an anaerobe. J Med Microbiol **40**:118-23.
102. **Singh, K. P., A. Morris, S. D. Lang, D. M. MacCulloch, and D. A. Bremner.** 1988. Clinically significant *Streptococcus anginosus* (*Streptococcus milleri*) infections: a review of 186 cases. N Z Med J **101**:813-6.
103. **Smith, R. F., and N. P. Willett.** 1968. Rapid plate method for screening hyaluronidase and chondroitin sulfatase-producing microorganisms. Appl Microbiol **16**:1434-6.
104. **Sultana, F., Y. Kawamura, X. G. Hou, S. E. Shu, and T. Ezaki.** 1998. Determination of 23S rRNA sequences from members of the genus *Streptococcus* and characterization of genetically distinct organisms previously identified as members of the *Streptococcus anginosus* group. FEMS Microbiol Lett **158**:223-30.
105. **Summanen, P. H., M. C. Rowlinson, J. Wooton, and S. M. Finegold.** 2009. Evaluation of genotypic and phenotypic methods for differentiation of the members of the *anginosus* group streptococci. Eur J Clin Microbiol Infect Dis **28**:1123-8.
106. **Tabata, A., K. Nakano, K. Ohkura, T. Tomoyasu, K. Kikuchi, R. A. Whiley, and H. Nagamune.** 2013. Novel twin streptolysin S-like peptides encoded in the *sag* operon homologue of beta-hemolytic *Streptococcus anginosus*. J Bacteriol **195**:1090-9.
107. **Takahashi, T., M. Ikegami-Kawai, R. Okuda, and K. Suzuki.** 2003. A fluorimetric Morgan-Elson assay method for hyaluronidase activity. Anal Biochem **322**:257-63.
108. **Takao, A.** 2003. Cloning and expression of hyaluronate lyase genes of *Streptococcus intermedius* and *Streptococcus constellatus* subsp. *constellatus*. FEMS Microbiol Lett **219**:143-50.
109. **Takao, A., H. Nagamune, and N. Maeda.** 2004. Identification of the *anginosus* group within the genus *Streptococcus* using polymerase chain reaction. FEMS Microbiol Lett **233**:83-9.
110. **Tenover, F. C., R. D. Arbeit, R. V. Goering, P. A. Mickelsen, B. E. Murray, D. H. Persing, and B. Swaminathan.** 1995. Interpreting chromosomal DNA

- restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* **33**:2233-9.
111. **Tomoyasu, T., H. Imaki, S. Masuda, A. Okamoto, H. J. Kim, R. D. Waite, R. A. Whiley, K. Kikuchi, K. Hiramatsu, A. Tabata, and H. Nagamune.** 2013. *LacR* mutations are frequently observed in *Streptococcus intermedius* and are responsible for increased intermedilysin production and virulence. *Infect Immun* **81**: 3276–86.
112. **Tracy, M., A. Wanahita, Y. Shuhatovich, E. A. Goldsmith, J. E. Clarridge, 3rd, and D. M. Musher.** 2001. Antibiotic susceptibilities of genetically characterized *Streptococcus milleri* group strains. *Antimicrob Agents Chemother* **45**:1511-4.
113. **Tuohy, M., and J. A. Washington.** 1997. Antimicrobial susceptibility of *viridans* group streptococci. *Diagn Microbiol Infect Dis* **29**:277-80.
114. **Van der Auwera, P.** 1985. Clinical significance of *Streptococcus milleri*. *Eur J Clin Microbiol* **4**:386-90.
115. **Vandamme, P., U. Torck, E. Falsen, B. Pot, H. Goossens, and K. Kersters.** 1998. Whole-cell protein electrophoretic analysis of *viridans* streptococci: evidence for heterogeneity among *Streptococcus mitis* biovars. *Int J Syst Bacteriol* **48**:117-125.
116. **Welborn, P. P., W. K. Hadley, E. Newbrun, and D. M. Yajko.** 1983. Characterization of strains of *viridans* Streptococci by deoxyribonucleic acid hybridization and physiological tests. *Int J Syst Bacteriol* **33**:293-299.
117. **Whatmore, A. M., V. A. Barcus, and C. G. Dowson.** 1999. Genetic diversity of the streptococcal competence (*com*) gene locus. *J Bacteriol* **181**:3144-54.
118. **Whiley, R. A., and D. Beighton.** 1998. Current classification of the oral streptococci. *Oral Microbiol Immunol* **13**:195-216.
119. **Whiley, R. A., and D. Beighton.** 1991. Emended descriptions and recognition of *Streptococcus constellatus*, *Streptococcus intermedius*, and *Streptococcus anginosus* as distinct species. *Int J Syst Bacteriol* **41**:1-5.
120. **Whiley, R. A., D. Beighton, T. G. Winstanley, H. Y. Fraser, and J. M. Hardie.** 1992. *Streptococcus intermedius*, *Streptococcus constellatus*, and *Streptococcus anginosus* (the *Streptococcus milleri* group): association with different body sites and clinical infections. *J Clin Microbiol* **30**:243-4.

121. **Whiley, R. A., B. Duke, J. M. Hardie, and L. M. Hall.** 1995. Heterogeneity among *16S-23S rRNA* intergenic spacers of species within the '*Streptococcus milleri* group'. Microbiology **141**:1461-7.
122. **Whiley, R. A., H. Fraser, J. M. Hardie, and D. Beighton.** 1990. Phenotypic differentiation of *Streptococcus intermedius*, *Streptococcus constellatus*, and *Streptococcus anginosus* strains within the "*Streptococcus milleri* group". J Clin Microbiol **28**:1497-501.
123. **Whiley, R. A., L. Freemantle, D. Beighton, J. R. Radford, J. M. Hardie, and G. Tillotsen.** 1993. Isolation, Identification and Prevalence of *Streptococcus anginosus*, *S. intermedius* and *S. constellatus* from the Human Mouth. Microb Ecol Health D **6**:285-291.
124. **Whiley, R. A., L. M. Hall, J. M. Hardie, and D. Beighton.** 1999. A study of small-colony, beta-haemolytic, Lancefield group C streptococci within the *anginosus* group: description of *Streptococcus constellatus* subsp. *pharyngis* subsp. nov., associated with the human throat and pharyngitis. Int J Syst Bacteriol **49**:1443-9.
125. **Whiley, R. A., L. M. C. Hall, J. M. Hardie, and D. Beighton.** 1997. Genotypic and phenotypic diversity within *Streptococcus anginosus*. Int J Syst Bacteriol **47**:645-650.
126. **Whiley, R. A., and J. M. Hardie.** 1989. DNA-DNA hybridization studies and phenotypic characteristics of strains within the '*Streptococcus milleri* group'. J Gen Microbiol **135**:2623-33.
127. **Wieser, A., L. Schneider, J. Jung, and S. Schubert.** 2012. MALDI-TOF MS in microbiological diagnostics-identification of microorganisms and beyond (mini review). Appl Microbiol Biotechnol **93**:965-74.
128. **Yap, R. L., L. A. Mermel, and J. Maglio.** 2006. Antimicrobial resistance of community-acquired bloodstream isolates of *viridans* group streptococci. Infection **34**:339-41.
129. **Young, K. A., R. P. Allaker, J. M. Hardie, and R. A. Whiley.** 1996. Interactions between *Eikenella corrodens* and '*Streptococcus milleri*-group' organisms: possible mechanisms of pathogenicity in mixed infections. Antonie Van Leeuwenhoek **69**:371-3.

## 6. Anexos

**Quadro 25:** Perfis alélicos das estirpes analisadas por MLST com recurso aos genes de MLSA.

Estirpe	PCR / identificação de Jensen <i>et al.</i>	ST	map	pfl	ppac	pyk	rpoB	sodA	tuf
CCUG 35181	<i>S. anginosus</i> genomosubspecies AJ1	56	15	15	26	25	12	17	7
CCUG 44049B	<i>S. anginosus</i> genomosubspecies AJ1	68	10	24	27	29	13	40	21
CCUG 52051	<i>S. anginosus</i> genomosubspecies AJ1	44	8	4	37	27	19	40	20
SH1279	<i>S. anginosus</i> subsp. <i>anginosus</i>	82	23	31	37	36	2	41	16
SH1543	<i>S. anginosus</i> subsp. <i>anginosus</i>	83	2	21	36	37	6	31	4
SH1582	<i>S. anginosus</i> subsp. <i>anginosus</i>	46	9	29	40	23	10	22	2
SH1602	<i>S. anginosus</i> subsp. <i>anginosus</i>	47	13	15	34	28	24	25	6
SH1616	<i>S. anginosus</i> subsp. <i>anginosus</i>	46	9	29	40	23	10	22	2
SH1623	<i>S. anginosus</i> subsp. <i>anginosus</i>	86	24	33	46	29	37	41	25
SH1733	<i>S. anginosus</i> subsp. <i>anginosus</i>	12	2	21	36	23	6	31	4
SH1754	<i>S. anginosus</i> subsp. <i>anginosus</i>	87	2	34	37	39	38	31	2
SH1770	<i>S. anginosus</i> subsp. <i>anginosus</i>	89	24	33	46	29	37	41	2
SH1779	<i>S. anginosus</i> subsp. <i>anginosus</i>	90	2	29	23	19	39	22	2
SH1801	<i>S. anginosus</i> subsp. <i>anginosus</i>	92	13	27	48	25	40	44	26
SH1808	<i>S. anginosus</i> subsp. <i>anginosus</i>	10	2	18	23	19	2	22	2
SH1819	<i>S. anginosus</i> subsp. <i>anginosus</i>	94	13	21	50	22	41	25	4
SH1828	<i>S. anginosus</i> subsp. <i>anginosus</i>	95	26	8	41	40	42	46	2
SH1832	<i>S. anginosus</i> subsp. <i>anginosus</i>	79	21	14	41	33	17	22	19
SH1834	<i>S. anginosus</i> subsp. <i>anginosus</i>	96	24	36	51	25	37	47	2
SH1835	<i>S. anginosus</i> subsp. <i>anginosus</i>	79	21	14	41	33	17	22	19
SH1840	<i>S. anginosus</i> subsp. <i>anginosus</i>	98	2	29	53	23	34	28	2
SH1852	<i>S. anginosus</i> subsp. <i>anginosus</i>	95	26	8	41	40	42	46	2
SH1855	<i>S. anginosus</i> subsp. <i>anginosus</i>	99	28	33	46	29	43	47	2
SH1870B	<i>S. anginosus</i> subsp. <i>anginosus</i>	79	21	14	41	33	17	22	19
SH1877	<i>S. anginosus</i> subsp. <i>anginosus</i>	10	2	18	23	19	2	22	2
SH1888	<i>S. anginosus</i> subsp. <i>anginosus</i>	68	10	24	27	29	13	40	21
SH2173	<i>S. anginosus</i> subsp. <i>anginosus</i>	38	2	29	40	23	34	28	2
SH2184	<i>S. anginosus</i> subsp. <i>anginosus</i>	109	15	36	3	25	12	41	7
SH2364	<i>S. anginosus</i> subsp. <i>anginosus</i>	79	21	14	41	33	17	22	19
SH3418B	<i>S. anginosus</i> subsp. <i>anginosus</i>	115	28	33	46	29	37	53	2
SH3423	<i>S. anginosus</i> subsp. <i>anginosus</i>	116	2	38	21	43	10	54	2
SH3427	<i>S. anginosus</i> subsp. <i>anginosus</i>	79	21	14	41	33	17	22	19
SH3887	<i>S. anginosus</i> subsp. <i>anginosus</i>	115	28	33	46	29	37	53	2
SH4259	<i>S. anginosus</i> subsp. <i>anginosus</i>	46	9	29	40	23	10	22	2
SH4295	<i>S. anginosus</i> subsp. <i>anginosus</i>	46	9	29	40	23	10	22	2
SH4306	<i>S. anginosus</i> subsp. <i>anginosus</i>	96	24	36	51	25	37	47	2
SH4314	<i>S. anginosus</i> subsp. <i>anginosus</i>	10	2	18	23	19	2	22	2
SH4927	<i>S. anginosus</i> subsp. <i>anginosus</i>	89	24	33	46	29	37	41	2
SH5112	<i>S. anginosus</i> subsp. <i>anginosus</i>	125	24	29	40	23	49	22	2
SH5262	<i>S. anginosus</i> subsp. <i>anginosus</i>	129	8	16	10	33	1	40	7
SH5264	<i>S. anginosus</i> subsp. <i>anginosus</i>	130	15	15	66	25	12	41	16
SH5333	<i>S. anginosus</i> subsp. <i>anginosus</i>	133	13	40	34	22	51	14	6
SH5364	<i>S. anginosus</i> subsp. <i>anginosus</i>	134	13	36	67	45	52	58	30
SH5761	<i>S. anginosus</i> subsp. <i>anginosus</i>	46	9	29	40	23	10	22	2
SH5871	<i>S. anginosus</i> subsp. <i>anginosus</i>	137	2	29	40	23	34	22	2
SH5965	<i>S. anginosus</i> subsp. <i>anginosus</i>	94	13	21	50	22	41	25	4
SH5998	<i>S. anginosus</i> subsp. <i>anginosus</i>	139	11	41	22	5	14	13	5
SH6028	<i>S. anginosus</i> subsp. <i>anginosus</i>	46	9	29	40	23	10	22	2
SH6185	<i>S. anginosus</i> subsp. <i>anginosus</i>	10	2	18	23	19	2	22	2
SH6190	<i>S. anginosus</i> subsp. <i>anginosus</i>	140	13	15	34	22	54	18	4
SH6252	<i>S. anginosus</i> subsp. <i>anginosus</i>	142	34	42	46	29	18	53	2
SH6260A	<i>S. anginosus</i> subsp. <i>anginosus</i>	115	28	33	46	29	37	53	2
SH6263	<i>S. anginosus</i> subsp. <i>anginosus</i>	144	35	43	69	47	52	40	16
CCUG 11668	<i>S. anginosus</i> subsp. <i>anginosus</i>	35	2	11	40	23	34	28	2
CCUG 28192	<i>S. anginosus</i> subsp. <i>anginosus</i>	47	13	15	34	28	24	25	6
CCUG 28195	<i>S. anginosus</i> subsp. <i>anginosus</i>	10	2	18	23	19	2	22	2
CCUG 32852	<i>S. anginosus</i> subsp. <i>anginosus</i>	45	9	29	40	16	10	22	2
CCUG 32886	<i>S. anginosus</i> subsp. <i>anginosus</i>	46	9	29	40	23	10	22	2
CCUG 34338	<i>S. anginosus</i> subsp. <i>anginosus</i>	38	2	29	40	23	34	28	2
CO1	<i>S. anginosus</i> subsp. <i>anginosus</i>	79	21	14	41	33	17	22	19

Estirpe	PCR / identificação de Jensen <i>et al.</i>	ST	map	pfl	ppac	pyk	rpoB	sodA	tuf
CO2	<i>S. anginosus</i> subsp. <i>anginosus</i>	64	21	14	9	33	17	22	19
SK1099	<i>S. anginosus</i> subsp. <i>anginosus</i>	13	2	7	20	22	21	18	3
SK1106	<i>S. anginosus</i> subsp. <i>anginosus</i>	37	2	29	21	33	10	31	2
SK1138	<i>S. anginosus</i> subsp. <i>anginosus</i>	43	8	18	10	33	1	40	16
SK1390	<i>S. anginosus</i> subsp. <i>anginosus</i>	15	8	8	10	33	1	40	16
SK1393	<i>S. anginosus</i> subsp. <i>anginosus</i>	48	13	16	34	22	18	14	2
SK1396	<i>S. anginosus</i> subsp. <i>anginosus</i>	11	2	21	36	23	6	16	4
SK1401	<i>S. anginosus</i> subsp. <i>anginosus</i>	12	2	21	36	23	6	31	4
SK1402	<i>S. anginosus</i> subsp. <i>anginosus</i>	36	2	29	20	22	21	32	3
SK1428	<i>S. anginosus</i> subsp. <i>anginosus</i>	65	2	18	41	23	18	10	15
<b>DSM 20563<sup>T</sup></b>	<i>S. anginosus</i> subsp. <i>anginosus</i>	18	13	5	22	5	27	21	17
SK534	<i>S. anginosus</i> subsp. <i>anginosus</i>	16	11	12	22	5	14	13	5
SH1559	<i>S. anginosus</i> subsp. <i>whileyi</i>	5	14	30	3	3	28	26	5
SH5974	<i>S. anginosus</i> subsp. <i>whileyi</i>	5	14	30	3	3	28	26	5
<b>DSM 25818<sup>T</sup></b>	<i>S. anginosus</i> subsp. <i>whileyi</i>	5	14	30	3	3	28	26	5
CO3B	<i>S. anginosus</i> subsp. <i>whileyi</i>	23	14	30	19	6	28	26	5
CO4B	<i>S. anginosus</i> subsp. <i>whileyi</i>	6	14	30	5	3	11	26	5
MAS 624	<i>S. anginosus</i> subsp. <i>whileyi</i>	21	14	30	15	3	28	26	5
SK1319	<i>S. anginosus</i> subsp. <i>whileyi</i>	25	14	30	29	3	28	26	5
SK1334	<i>S. anginosus</i> subsp. <i>whileyi</i>	7	14	3	19	3	28	26	5
SK1340	<i>S. anginosus</i> subsp. <i>whileyi</i>	3	12	30	3	3	28	26	5
SK1345	<i>S. anginosus</i> subsp. <i>whileyi</i>	22	14	30	19	3	28	26	5
SK1350	<i>S. anginosus</i> subsp. <i>whileyi</i>	24	14	30	29	3	11	26	5
SK1357	<i>S. anginosus</i> subsp. <i>whileyi</i>	8	14	3	29	3	28	26	5
SK1366	<i>S. anginosus</i> subsp. <i>whileyi</i>	20	14	30	11	3	28	26	5
SH0358	<i>S. constellatus</i> subsp. <i>constellatus</i>	80	22	27	44	35	35	5	13
SH1048	<i>S. constellatus</i> subsp. <i>constellatus</i>	81	15	1	1	32	26	5	10
SH1546	<i>S. constellatus</i> subsp. <i>constellatus</i>	84	14	27	8	9	26	42	2
SH1756	<i>S. constellatus</i> subsp. <i>constellatus</i>	88	14	35	1	32	26	5	8
SH1794	<i>S. constellatus</i> subsp. <i>constellatus</i>	91	7	27	47	32	30	19	10
SH1810	<i>S. constellatus</i> subsp. <i>constellatus</i>	93	25	27	49	14	33	45	10
SH1838	<i>S. constellatus</i> subsp. <i>constellatus</i>	97	27	27	52	9	26	30	8
SH1865	<i>S. constellatus</i> subsp. <i>constellatus</i>	100	14	27	1	32	33	38	10
SH1881	<i>S. constellatus</i> subsp. <i>constellatus</i>	101	14	30	54	32	26	6	27
SH1895A	<i>S. constellatus</i> subsp. <i>constellatus</i>	102	14	27	55	32	26	48	10
SH1958	<i>S. constellatus</i> subsp. <i>constellatus</i>	103	15	27	56	9	26	11	7
SH1964	<i>S. constellatus</i> subsp. <i>constellatus</i>	104	29	27	8	9	44	38	10
SH1969	<i>S. constellatus</i> subsp. <i>constellatus</i>	105	14	27	8	10	26	7	13
SH1984	<i>S. constellatus</i> subsp. <i>constellatus</i>	107	14	27	1	32	45	50	10
SH3043	<i>S. constellatus</i> subsp. <i>constellatus</i>	110	14	15	58	32	26	38	10
SH3045	<i>S. constellatus</i> subsp. <i>constellatus</i>	111	14	27	1	42	23	6	28
SH3413	<i>S. constellatus</i> subsp. <i>constellatus</i>	112	15	1	59	8	33	52	10
SH3415	<i>S. constellatus</i> subsp. <i>constellatus</i>	113	18	20	8	31	20	36	10
SH3416	<i>S. constellatus</i> subsp. <i>constellatus</i>	114	15	30	60	10	26	38	29
SH3691	<i>S. constellatus</i> subsp. <i>constellatus</i>	117	14	26	42	32	33	24	8
SH3884	<i>S. constellatus</i> subsp. <i>constellatus</i>	118	14	27	52	32	45	29	10
SH3897	<i>S. constellatus</i> subsp. <i>constellatus</i>	119	15	30	8	9	47	38	13
SH4233	<i>S. constellatus</i> subsp. <i>constellatus</i>	120	14	30	61	14	48	7	10
SH4788	<i>S. constellatus</i> subsp. <i>constellatus</i>	122	14	39	63	32	16	38	10
SH4800	<i>S. constellatus</i> subsp. <i>constellatus</i>	123	14	30	64	32	33	56	10
SH4805	<i>S. constellatus</i> subsp. <i>constellatus</i>	124	14	30	65	32	26	56	10
SH5101	<i>S. constellatus</i> subsp. <i>constellatus</i>	103	15	27	56	9	26	11	7
SH5102	<i>S. constellatus</i> subsp. <i>constellatus</i>	55	14	30	8	10	33	34	10
SH5113	<i>S. constellatus</i> subsp. <i>constellatus</i>	126	14	27	8	32	29	11	10
SH5119	<i>S. constellatus</i> subsp. <i>constellatus</i>	127	14	27	1	44	33	38	10
SH5136	<i>S. constellatus</i> subsp. <i>constellatus</i>	128	25	27	11	14	33	45	10
SH5266	<i>S. constellatus</i> subsp. <i>constellatus</i>	131	15	1	8	32	30	24	10
SH5517	<i>S. constellatus</i> subsp. <i>constellatus</i>	100	14	27	1	32	33	38	10
SH5680	<i>S. constellatus</i> subsp. <i>constellatus</i>	136	33	27	44	35	30	5	13
SH5953	<i>S. constellatus</i> subsp. <i>constellatus</i>	100	14	27	1	32	33	38	10
SH5977	<i>S. constellatus</i> subsp. <i>constellatus</i>	138	14	27	58	46	33	38	13
SH6193	<i>S. constellatus</i> subsp. <i>constellatus</i>	141	15	27	8	32	26	59	13
SH6262	<i>S. constellatus</i> subsp. <i>constellatus</i>	143	7	30	68	32	55	60	10
CCUG 28199	<i>S. constellatus</i> subsp. <i>constellatus</i>	4	14	27	14	8	23	8	8
CCUG 28467	<i>S. constellatus</i> subsp. <i>constellatus</i>	14	5	30	33	9	22	11	8
CCUG 33199	<i>S. constellatus</i> subsp. <i>constellatus</i>	73	14	30	11	17	33	29	10

Estirpe	PCR / identificação de Jensen <i>et al.</i>	ST	map	pfl	ppac	pyk	rpoB	sodA	tuf
CCUG 33235	<i>S. constellatus</i> subsp. <i>constellatus</i>	30	15	27	8	9	26	35	10
CCUG 36736	<i>S. constellatus</i> subsp. <i>constellatus</i>	1	7	30	8	4	8	6	10
CCUG 4215	<i>S. constellatus</i> subsp. <i>constellatus</i>	29	15	20	1	13	15	5	10
CCUG 55196	<i>S. constellatus</i> subsp. <i>constellatus</i>	57	15	30	33	8	26	38	13
CCUG 9569	<i>S. constellatus</i> subsp. <i>constellatus</i>	9	14	6	4	21	26	30	2
SK1091	<i>S. constellatus</i> subsp. <i>constellatus</i>	42	7	27	8	34	30	19	10
SK1315	<i>S. constellatus</i> subsp. <i>constellatus</i>	51	14	26	42	32	16	24	8
SK1403	<i>S. constellatus</i> subsp. <i>constellatus</i>	60	19	20	6	31	20	36	10
SK1414	<i>S. constellatus</i> subsp. <i>constellatus</i>	19	14	23	38	32	26	9	8
SK1417	<i>S. constellatus</i> subsp. <i>constellatus</i>	41	7	17	8	32	30	15	10
SK1422	<i>S. constellatus</i> subsp. <i>constellatus</i>	55	14	30	8	10	33	34	10
SK1424	<i>S. constellatus</i> subsp. <i>constellatus</i>	53	14	27	1	32	33	27	10
SK1429	<i>S. constellatus</i> subsp. <i>constellatus</i>	2	17	19	8	9	4	38	1
SK439	<i>S. constellatus</i> subsp. <i>constellatus</i>	77	18	20	25	10	20	36	10
SK455	<i>S. constellatus</i> subsp. <i>constellatus</i>	40	6	27	43	32	26	3	13
SK457	<i>S. constellatus</i> subsp. <i>constellatus</i>	49	14	15	8	32	25	30	10
SK464	<i>S. constellatus</i> subsp. <i>constellatus</i>	58	18	1	17	31	20	38	10
SK498	<i>S. constellatus</i> subsp. <i>constellatus</i>	67	7	27	30	26	29	11	23
SK512	<i>S. constellatus</i> subsp. <i>constellatus</i>	28	14	30	8	32	33	2	10
SK518	<i>S. constellatus</i> subsp. <i>constellatus</i>	78	19	27	35	31	20	36	10
SK524	<i>S. constellatus</i> subsp. <i>constellatus</i>	59	19	20	13	31	20	36	9
<b>DSM 20575<sup>T</sup></b>	<i>S. constellatus</i> subsp. <i>constellatus</i>	54	14	27	31	14	26	7	10
SK535	<i>S. constellatus</i> subsp. <i>constellatus</i>	52	14	27	12	10	26	7	13
SK541	<i>S. constellatus</i> subsp. <i>constellatus</i>	33	19	20	18	31	3	4	10
SK551	<i>S. constellatus</i> subsp. <i>constellatus</i>	50	14	15	8	32	33	29	10
SH1544	<i>S. constellatus</i> subsp. <i>pharyngis</i>	76	14	30	39	32	26	20	17
SH4349	<i>S. constellatus</i> subsp. <i>pharyngis</i>	76	14	30	39	32	26	20	17
CCUG 38579	<i>S. constellatus</i> subsp. <i>pharyngis</i>	69	14	27	16	32	26	37	17
<b>DSM 17475<sup>T</sup></b>	<i>S. constellatus</i> subsp. <i>pharyngis</i>	70	14	27	16	32	26	38	17
CCUG 48768	<i>S. constellatus</i> subsp. <i>pharyngis</i>	66	3	27	16	32	26	38	17
SK1327	<i>S. constellatus</i> subsp. <i>pharyngis</i>	71	14	27	16	32	30	38	17
SK1342	<i>S. constellatus</i> subsp. <i>viborgensis</i>	27	14	30	7	2	26	20	17
SK1349	<i>S. constellatus</i> subsp. <i>viborgensis</i>	72	14	27	39	32	26	20	17
<b>DSM 25819<sup>T</sup></b>	<i>S. constellatus</i> subsp. <i>viborgensis</i>	76	14	30	39	32	26	20	17
SK1360	<i>S. constellatus</i> subsp. <i>viborgensis</i>	26	14	30	39	2	26	20	5
SK1364	<i>S. constellatus</i> subsp. <i>viborgensis</i>	75	14	30	39	18	26	20	17
SK1375	<i>S. constellatus</i> subsp. <i>viborgensis</i>	74	14	30	39	15	26	20	17
SH1607	<i>S. intermedius</i>	85	20	32	45	38	36	43	24
SH1975	<i>S. intermedius</i>	106	20	32	45	38	36	49	12
SH2172	<i>S. intermedius</i>	108	30	37	57	41	46	51	22
SH4251	<i>S. intermedius</i>	121	31	32	62	11	36	55	12
SH5267	<i>S. intermedius</i>	132	32	10	28	22	50	57	18
SH5554	<i>S. intermedius</i>	135	20	13	28	11	53	1	22
CCUG 11578	<i>S. intermedius</i>	39	4	22	28	1	31	12	12
CCUG 28203	<i>S. intermedius</i>	63	20	25	28	24	7	39	18
CCUG 28760	<i>S. intermedius</i>	32	16	9	28	20	5	33	22
SK1110	<i>S. intermedius</i>	61	20	10	32	7	32	12	12
SK1427	<i>S. intermedius</i>	31	16	9	28	12	5	33	11
SK478	<i>S. intermedius</i>	34	20	2	2	11	32	12	12
SK511	<i>S. intermedius</i>	62	20	13	24	11	32	1	22
<b>DSM 20573<sup>T</sup></b>	<i>S. intermedius</i>	17	1	28	28	30	9	23	14

A terminologia que precede a numeração indica a coleção de origem das estirpes: “SH” - Coleção de estirpes invasivas do presente estudo; “SK”, “CCUG” e “CO” - coleção de Jensen *et al.* (2013) (64); “DSM” - Estirpes da coleção Alemã “Leibniz-Institute DSMZ - German collection of Microorganisms and Cell Cultures”, destacadas a negrito.

**Quadro 26:** Oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas reações de PCR.

	Gene alvo	Iniciador	Autor	Sequência (5'-3')	Tamanho (pb)	Fragmento amplificado
<b>Identificação para o grupo</b>	<i>pbp2b</i>	<i>MIL2B-U</i>	(109)	TGCTGCAACGGTAGCTAATGG	21	275 pb
		<i>MIL2B-D</i>	(109)	CAAAGGTTTCTGCTGTCCCTG	21	
<b>Identificação da espécie ou subespécie</b>	<i>Hyaluronidase</i>	<i>HYL-INT-D</i>	(109)	GCTGTATCAATTGGAGTGTCTGTC	24	428 pb
		<i>HYL-MIX-U</i>	(109)	TGGTGGGAYTAYGARATYGG	20	
		<i>HYL-CC-D</i>	(109)	CTCTCTCTTGAGATTGTTGC	20	
	<i>rRNA 16S</i>	<i>16S-ANG-U</i>	(109)	GCGTAGGTAACCTGCCTATTAGA	23	105 pb
		<i>16S-ANG-D</i>	(109)	CGCAGGTCCATCTACTAGC	19	
	<i>ily</i>	<i>ILY-4DFw</i>	(109)	CTCACCTCAATCATGATGGTGC	23	819 pb
		<i>ILY-wholeC Bw</i>	(109)	CGACTCACTATAGGGAGATCAGCATGG	27	
	<i>Methionine</i>	<i>map-up</i>	(14)	GCWGACTCWTGTTGGGCWTATGC	23	348 pb
<b>MLSA*</b>	<i>Aminopeptidase (map)</i>	<i>map-dn</i>	(14)	TTARTAAGTTCYTTCTTCDCCTTG	24	
	<i>Pyruvate formate lyase (pfl)</i>	<i>pfl-up</i>	(14)	AACGTTGCTTACTCTAAACAAACTGG	26	351 pb
		<i>pfl-dn</i>	(14)	ACTTCRTGGAAGACACGTTGWGTC	24	
	<i>Inorganic Pyrophosphatase (ppaC)</i>	<i>ppac-up</i>	(14)	GACCAYAATGAATTYCARCAATC	23	552 pb
		<i>ppac-dn</i>	(14)	TGAGGNACMACTTGTSTTACG	23	
	<i>Pyruvate kinase (pyk)</i>	<i>pyk-up</i>	(14)	GCGGTWGAAWTCCGTGGTG	19	492 pb
		<i>pyk-dn</i>	(14)	GCAAGWGCTGGGAAAGGAAT	20	
	<i>RNA polymerase beta</i>	<i>rpoB-up</i>	(14)	AARYTIGGMCCTGAAGAAAT	20	516 pb
	<i>Subunit (rpoB)</i>	<i>rpoB-dn</i>	(14)	TGIARTTTRTCATCAACCATGTG	23	
	<i>Superoxide dismutase (sodA)</i>	<i>sodA-up</i>	(94)	CCNTAYNCNTAYGAYGCNYTNGARCC	26	378 pb
		<i>sodA-dn</i>	(94)	ARRTARTANGCRTGYTCCCANACRTC	26	
	<i>Elongation factor Tu (tuf)</i>	<i>tuf-up</i>	(14)	GTTGAAATGGAAATCCGTGACC	22	426 pb
		<i>tuf-dn</i>	(14)	GTTGAAGAATGGAGTGTGACG	21	

\*No caso dos genes utilizados para MLSA o tamanho do fragmento amplificado corresponde apenas à sequência que foi comparada

**Quadro 27:** Programas utilizados nas reações de PCR com os diferentes oligonucleotídeos iniciadores. “s” – segundos; “min” - minutos.

Iniciadores	<i>MIL-2B</i>			<b>Multiplex: <i>HYL, ILY e rRNA 16S</i></b>			<i>map, pfl, ppaC, puk, rpoB, tuf</i>			<i>sodA</i>		
	Temperatura	Tempo	Ciclos	Temperatura	Tempo	Ciclos	Temperatura	Tempo	Ciclos	Temperatura	Tempo	Ciclos
<b>Desnaturação</b>	95°C	2 min	1 x	95°C	2 min	1 x	94°C	5 min	1 x	94°C	4 min	1 x
<b>Desnaturação</b>	98°C	30 s		98°C	30 s		94°C	1 min		94°C	45 s	
<b>Hibridação</b>	58°C	30 s	30 x	58°C	30 s	30 x	50°C	1 min	30 x	37°C	90 s	10 x
<b>Alongamento</b>	70°C	1 min		70°C	1 min		72°C	1 min		72°C	90 s	
<b>Desnaturação</b>										94°C	45 s	
<b>Hibridação</b>										50°C	90 s	30 x
<b>Alongamento</b>										72°C	90 s	
<b>Terminação</b>	70°C	2 min	1 x	70°C	2 min	1 x	72°C	5 min		72°C	10 min	1 x